



# Avaliação fototóxica e *screening* mutagênico de extratos de propolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana*

Ramos, M.F.S.<sup>1\*</sup>; Santos, E.P.<sup>1</sup>; Silva, A.B.<sup>3</sup>; Leitão, A.C.<sup>3</sup>; Dellamora-Ortiz, G.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Recebido 02/08/05 / Aceito 26/10/05

## RESUMO

A utilização de extratos vegetais em produtos farmacêuticos e cosméticos tem mostrado ser uma tendência mundial e cresceu substancialmente nas duas últimas décadas. No entanto, há ainda poucos relatos na literatura com relação à atividade mutagênica ou fototóxica de extratos vegetais. No presente trabalho foi avaliada a atividade fototóxica e o “screening” mutagênico de extratos fluidos e secos de própolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana*. Na investigação de fototoxicidade foram realizados ensaios microbiológicos, utilizando cepas de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como ensaios biológicos com cobaias albinas. Extratos etanólicos de *Ruta graveolens* e *Citrus* spp., além de 8-metoxipsoraleno (fármaco sintético padrão), foram usados como controles positivos em ambos os testes. A atividade mutagênica foi avaliada qualitativamente segundo o “spot test” descrito por Maron & Ames, com cepas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102, empregando como controle positivo o óxido de 4-nitroquinolina. Não foi observada atividade fototóxica, em ambos os ensaios realizados, para qualquer dos extratos. O ensaio microbiológico demonstrou uma atividade fungistática ou fungicida nos extratos secos de hamamélis. Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos com a levedura *S. cerevisiae* indicam que este microrganismo apresentou eficiência no procedimento de “screening” de atividade fototóxica comparável à obtida com *C. albicans*. Os extratos vegetais não apresentaram atividade mutagênica nos ensaios preliminares realizados.

*Palavras-chave:* *Aloe* spp., *Hamamelis virginiana*, própolis, fototoxicidade, mutagenicidade.

## INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta é responsável por numerosos danos à pele, entre eles o eritema calórico, a queimadura solar, o fotoenvelhecimento, a fotosensibilidade e o mais grave entre eles, o câncer de pele. A fotosensibilidade pode gerar reações fotoalérgicas e fototóxicas. Estas últimas ocorrem geralmente quando uma substância fotoreativa é exposta à radiação solar e a radiações de comprimento de

onda de 200 a 400 nm, que são as principais responsáveis por esta resposta cutânea (Epstein, 1999). Os principais efeitos destas reações são eritemas, edemas, esfoliações e hiperpigmentação. Reações fotoalérgicas, entretanto, envolvem uma ativação do sistema imune. Neste caso, a luz solar promove reações entre as substâncias alergênicas e as proteínas da pele gerando uma resposta imunológica e posterior produção de anticorpos específicos (Dupuis & Benezra, 1982).

A exposição excessiva à luz solar pode causar, portanto, danos irreparáveis à pele, entre estes o mais grave, o câncer de pele, cuja maior incidência ocorre em países tropicais como o Brasil (Programa nacional do controle de câncer de pele, 2004).

O conhecimento de que certas plantas causam hipersensibilização é milenar e tal fato levou ao desenvolvimento da fotoquimioterapia, usada hoje para o tratamento do vitiligo, psoríase e outras dermatites (Lovell, 1993).

As furocumarinas são a maior classe de substâncias que causam reações fototóxicas em humanos. Estas substâncias são encontradas frequentemente nas famílias Umbelliferae, Rutaceae, Moraceae e Leguminosae, tendo o bergapteno e o psoraleno como os principais representantes desta classe de compostos (Lovell, 1993).

Extratos de hamamélis (*Hamamelis virginiana*), aloé (*Aloe* spp.) e própolis têm sido utilizados na medicina popular por suas atividades antiinflamatórias e antimicrobianas. O hamamelis também apresenta propriedade vasoconstritora periférica e adstringente devido à presença dos taninos (Costa, 1978). A aplicação tópica de destilados de hamamélis sobre a pele apresentou uma atividade antiinflamatória (Korting et al., 1993), que foi posteriormente confirmada por Duwiejua et al. (1994) em modelo de edema de pata em rato. Loções contendo 10% de destilados de hamamélis levaram a uma depressão de 20-27% do eritema causado pela radiação UVB (Hughes-Formella et al., 1998; Hughes-Formella et al., 2002). Masaki et al. (1995) confirmaram que o hamamelitanino apresenta um importante efeito protetor aos danos celulares causados pela radiação UVB, mostrando também uma potente atividade antioxidante. O Aloe também tem sido intensamente estudado, em especial o produto “gel de Aloe”, cuja ação inibitória sobre o processo inflamatório tem sido

\*Autor Correspondente: Mônica Freiman de Souza Ramos - Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco K 20 andar sala 50, 21941-940, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Email: freiman@olimpico.com.br, Fone: 55-021-2125626403, Fax: 55-021-2125626445.

investigada. Estudos de Lee et al. (1999) demonstraram que compostos de baixo peso molecular presentes no gel de aloe apresentaram potente efeito imunossupressor na pele através da restauração dos danos causados pela radiação UVB nas células de Langerhans da epiderme de rato.

A própolis é uma mistura resinosa produzida pelas abelhas, à qual são atribuídas inúmeras atividades entre elas antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória e antioxidante (Amoros et al., 1994; Bankova et al., 1995; Basnet et al., 1997; Burdock, 1998; Kujumgiev et al., 1999; Rossi et al., 2002). Seu emprego foi descrito pelos assírios, gregos, romanos e egípcios. Na África do Sul foi empregada na guerra do final do século XIX, como cicatrizante. Estudos multicêntricos demonstraram que loções contendo própolis foram efetivas por reduzirem os sintomas e as lesões causadas por herpes genital (Vynograd et al., 2000). A própolis é considerada segura em doses baixas e efeitos adversos são comuns em doses acima de 15 g / dia, sendo as reações alérgicas e irritações cutâneas os efeitos mais comumente observados (Castaldo & Capasso, 2002).

Na última década tem sido observado um crescimento do uso de produtos farmacêuticos e cosméticos contendo extratos naturais. No entanto, muito pouco tem sido descrito sobre os efeitos toxicológicos e fototóxicos destes produtos. Com exceção de Volpert & Elstner (1993), que relataram a ação fotodinâmica da própolis, pouco tem sido descrito sobre a atividade fototóxica e mutagênica destes extratos. Tendo em vista a importância de obter informações mais detalhadas sobre estes efeitos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade fototóxica e realizar um “screening” mutagênico de extratos de própolis, hamamélis e aloe.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material:** Folhas secas de *Hamamelis virginiana* foram obtidas da Sanrizil (São Paulo, Brazil) e identificadas botanicamente pela Prof<sup>a</sup> Magda R. S. Padilha do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Ramos et al., 1996). O pó seco de *Aloe* spp. foi fornecido pelo Prof. Dr. Hélio de Mattos Alves do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFRJ, e foi obtido segundo descrição de Costa (1970) a partir de uma espécie de Aloe presente no Campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A própolis foi coletada na região de Sapucaia (Rio de Janeiro, Brasil), com predominância de flora local de *Citrus* spp. e *Verona polyanthes*.

Extrato de levedura, malte, bactopectona e bactoagar foram adquiridos da Difco Laboratories (Detroit, Estados Unidos). O 8-metoxipsoraleno foi adquirido da Galderma (Freiburg, Alemanha). O creme depilatório Elegan Hair Remover foi obtido da Wella Ind. (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os outros reagentes eram de alto grau de pureza.

**Preparação dos extratos:** Os extratos alcoólicos foram preparados a partir de materiais secos (pó, folhas e resina bruta) previamente pulverizados de *Aloe* spp., *Hamamelis virginiana* e própolis (resina bruta) utilizando etanol (grau analítico) como solvente. A extração de 100 mg destes materiais em 500 ml de solvente foi realizada em um forno de microondas (Philco PMV-1000), à potência mínima por

5 minutos (Collin & Gagnon, 1991). O extrato fluido de cada droga foi obtido após filtração e concentração à pressão reduzida até concentração final de 1 mL de extrato para 1 g de droga.

Os extratos secos foram obtidos por evaporação à pressão reduzida (30 a 40°C) de 20 ml de cada extrato fluido e os resíduos da evaporação foram liofilizados (liofilizador Edwards do Brasil).

Os extratos de *Ruta graveolens* (arruda) e *Citrus* spp. (limão) foram preparados a partir de 20 g de planta fresca por maceração com 100 ml de etanol.

**Preparação das amostras:** Para avaliação da atividade fototóxica, os extratos fluidos e secos das três drogas foram suspensos em etanol na concentração de 10% (p/v). Os extratos alcoólicos de limão (*Citrus* spp.) e arruda (*Ruta graveolens*), assim como uma solução de 8-metoxipsoraleno (8-MOP) a 0,1% foram usados como controles positivos.

Para os ensaios de atividade mutagênica, extratos secos das três drogas foram diluídos em etanol em concentrações de 10%, 0,1% e 0,01% (p/v). Uma solução de 100 µg L<sup>-1</sup> de óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) foi empregada como padrão mutagênico e o solvente (etanol) como controle negativo do experimento.

**Ensaio fotomicrobiológico:** Cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* (D273-10B) e *Candida albicans* (ATCC 10231) foram utilizadas para o ensaio microbiológico da atividade fototóxica. O meio para crescimento de *S. cerevisiae* foi constituído por: 1% de extrato de levedo, 2% de glicose, 2% de peptona e 1,5% de agar (Tenan et al., 1985). Para *C. albicans*, a composição do meio foi: 0,3% extrato de levedo, 0,2% extrato de malte, 1% glicose, 0,5% peptona e 1,5% de agar.

O ensaio microbiológico foi baseado no procedimento descrito por Daniels (1965). Uma suspensão de cada microrganismo foi preparada a partir de um repique de 24 h em agar inclinado, em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 6. Alíquotas de 0,15 ml desta suspensão foram espalhadas em placas contendo meio de cultura.

Alíquotas de 10 ml de cada amostra foram aplicadas em discos de papel de filtro Whatman nº 1, estéreis, de 6 mm de diâmetro, que foram fixados na superfície das placas.

As placas teste foram colocadas a uma distância de 22 cm de uma lâmpada de luz negra de 15 Watts de potência, de comprimento de onda de 300-390nm (UVA) com uma dose de radiação de 10,36 kJ m<sup>-2</sup>. As placas controle foram guardadas no escuro.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados aplicando análise de variância empregando ANOVA, seguida do teste de *Student* com nível de significância de  $p < 0,05$ .

**Atividade fototóxica in vivo:** Um grupo de quatro cobaias albinos Dunkin-Hartley (Buehler et al., 1985) de 300 a 450 gramas cada um, foi utilizado para cada amostra. Cada animal teve seu pelo raspado com auxílio de um tosador Wahl Helmet e em seguida foi depilado com creme depilatório Elegan. O creme foi removido com água e a pele dos animais seca com uma toalha. Após 18 a 20 h, a pele do dorso dos animais apresentava-se visivelmente íntegra, sem sinais de irritação e a região dorsal foi dividida em quatro áreas de cerca de 2,5 cm<sup>2</sup> com uma fita adesiva

3M de 12 mm. Em duas destas áreas, foram aplicados 0,1 ml de amostra (extrato) e nas outras duas áreas foram aplicados 0,1 ml de solução 0.1% de 8-MOP (padrão positivo).

Uma das áreas contendo a amostra e 8-MOP foi coberta com uma folha de alumínio e fixada com fita adesiva. A cabeça dos animais foi coberta e estes foram colocados a 10 cm (região dorsal) de distância de uma lâmpada de luz negra fluorescente de 15 Watts, sendo submetidos a 2 h de incidência de radiação. Após 24 e 48 h da exposição, os animais foram observados e a intensidade dos eritemas avaliada segundo a escala: 0 = nenhuma reação, 1 = eritema fraco, 2 = eritema moderado e 3 = eritema severo.

**Atividade mutagênica:** A mutagenicidade foi avaliada utilizando parcialmente a metodologia de Maron & Ames (1983), pois foram utilizadas as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (*spot test*), sem sistema de metabolização. Como controle positivo foi empregado a 4-nitroquinolina.

As células foram inoculadas em meio LB (Miller, 1972) e incubadas a 37°C *overnight* para crescimento. Alíquotas de 100 µl de uma suspensão de 10<sup>9</sup> células foram espalhadas em placas contendo meio E (Vogel e Bonner, 1956) solidificado com 1,5% de agar (Bacto Difco). Em seguida, alíquotas de 10 µl de cada amostra foram aplicadas em discos de papel Whatman nº 1, estéreis, de seis mm de diâmetro, que foram fixados na superfície das placas. Após incubação a 37°C por dois dias, colônias visíveis foram contadas.

## RESULTADOS

### Ensaio microbiológicos

O ensaio de fototoxicidade microbiológica foi baseado no trabalho de Farrington (1985), que sugere um teste microbiológico utilizando a cepa de *C. albicans* como um procedimento alternativo para *screening* fototóxico de fármacos e outras moléculas. Neste trabalho foi utilizada a

mesma metodologia, entretanto também foi avaliado o desempenho da levedura *S. cerevisiae* como microrganismo alternativo para o ensaio. Diferentemente de *C. albicans*, a levedura *S. cerevisiae* detém o “GRAS status” (*generally regarded as safe*), não apresentando infectividade e patogenicidade em seres humanos.

Neste ensaio, a fototoxicidade é evidenciada pelo aparecimento de uma zona clara ao redor da amostra, quando as placas são submetidas à radiação ultravioleta. A zona clara, indicando inibição de crescimento, é normalmente ausente na placas incubadas na ausência de luz.

Os extratos de limão e arruda foram utilizados como controles positivos de origem vegetal e são reconhecidos agentes fototóxicos, cuja ação fototóxica decorre da presença de furocumarinas (Lovell, 1993). Ambos extratos mostraram fototoxicidade equivalente ao 8-MOP com ambas as cepas, indicando que o teste apresenta resposta positiva e coerente com os resultados observados para o fármaco sintético usado como padrão.

A Tabela 1 apresenta a atividade fototóxica dos extratos alcoólicos e do 8-MOP em ensaios fotomicrobiológicos com cepas de *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

### Ensaio *in vivo*

Como evidenciado na Tabela 2, nenhum dos três extratos apresentou atividade fototóxica sobre a pele de cobaias após duas horas de exposição à radiação ultravioleta. Por outro lado, a solução de 8-MOP induziu o aparecimento de eritema de intensidade fraca à moderada.

### Atividade Mutagênica

Os resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade empregando o *spot test* não indicaram atividade mutagênica para nenhum dos extratos, nas três concentrações avaliadas como observado na Tabela 3.

Tabela 1 - Atividade fototóxica dos extratos alcoólicos e do 8-MOP em ensaios fotomicrobiológicos com cepas de *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

Extratos	<i>C. albicans</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	Luz UVA	Escuro	Luz UVA	Escuro
<i>Ruta graveolens</i> *	22,5 ± 1,8 <sup>†</sup>	-	18,5 ± 1,7 <sup>†</sup>	-
<i>Citrus</i> spp.*	22,5 ± 2,4 <sup>†</sup>	-	21 ± 3,4 <sup>†</sup>	-
8-MOP	23,7 ± 1,7 <sup>†</sup>	-	22 ± 3,2 <sup>†</sup>	-
<i>Aloe</i> spp. (fluido)*	-	-	-	-
<i>Aloe</i> spp. (seco)*	-	-	-	-
<i>H. virginiana</i> (fluido)*	-	-	-	-
<i>H. virginiana</i> (seco)*	13,2 ± 0,6 <sup>†</sup>	13,1 ± 1,2 <sup>†</sup>	-	-
Própolis (fluido)*	-	-	-	-
Própolis (seco)*	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-

\* Todos os extratos foram suspensos em etanol a 10% (p/v).

<sup>†</sup> Resultados foram expressos pela ausência ou presença de zonas de inibição de crescimento (média ± D.V. do diâmetro de halo)

Tabela 2 - Atividade fototóxica "in vivo" de 8-MOP e dos extratos de hamamélis aloe e própolis.

Indução	Incidência	Intensidade do eritema <sup>†</sup>
8-MOP + UVA	4/4	1,625 ± 0,377
8-MOP	0/4	0
<i>H. virginiana</i> * + UVA	0/4	0
<i>H. virginiana</i> *	0/4	0
8-MOP + UVA	4/4	1,875 ± 0,377
8-MOP	0/4	0
Própolis* + UVA	0/4	0
Própolis*	0/4	0
8-MOP + UVA	4/4	1,625 ± 0,377
8-MOP	0/4	0
<i>Aloe</i> spp.* + UVA	0/4	0
<i>Aloe</i> spp.*	0/4	0

\* Os extratos foram suspensos em etanol 10% (p/v).

† Intensidade dos eritemas (média ± S.D.)

Tabela 3 - Atividade mutagênica de extratos secos de aloe, hamamelis e propolis, 4-NQO e etanol sobre cepas de *S. typhimurium* sem ativação metabólica.

	<i>S. typhimurium</i>			
	TA97	TA98	TA100	TA102
<i>Aloe</i> spp.*	-	-	-	-
Própolis*	-	-	-	-
<i>H. virginiana</i> *	-	-	-	-
4-NQO	+	+	+	+
Etanol	-	-	-	-

\*Os extratos foram suspensos em etanol a 10%, 0,1% e 0,01% (p/v).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos com os extratos em estudo demonstraram que tanto os extratos fluidos quanto os extratos secos dos três produtos naturais avaliados não apresentaram fototoxicidade, e que a ausência de fototoxicidade não está relacionada à concentração do extrato, pois o extrato seco é cerca de 100 vezes mais concentrado que o extrato fluido. O etanol utilizado como solvente para os extratos não mostrou reação de fototoxicidade e sequer promoveu inibição do crescimento dos microrganismos.

Com o extrato seco de hamamélis foi observado o aparecimento de zonas de inibição de crescimento após o período de incubação, tanto na presença quanto na ausência de luz ultravioleta, para *C. albicans* sugerindo uma atividade fungistática. O mesmo resultado não foi observado para o extrato fluido, o que indica que esta ação está relacionada à concentração do extrato.

Foi observada ausência de atividade fungistática no extrato de própolis para ambos os microrganismos. Este resultado foi semelhante ao citado por Ghisalberti (1979) para *S. cerevisiae* e difere dos observados por Metzner et al. (1977) e Tosi et al. (1996), que descrevem a atividade

inibitória da própolis em ambas as cepas. A forte inibição no crescimento de *C. albicans* por extratos de própolis é descrita em inúmeros trabalhos, indicando a ação antifúngica da própolis sobre esta levedura (Kujumgiev et al., 1999; Cafarchia et al., 1999; Hegazi et al., 2000). Estes resultados contraditórios possivelmente estão relacionados à complexa e variada composição química da própolis. Segundo Bankova et al. (1998 e 2000), a própolis apresenta diferenciações em sua composição, segundo sua região de origem. A própolis oriunda de regiões temperadas, como a Europa, apresenta uma menor variação em sua composição e um alto teor de flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos, já as amostras de zonas tropicais são ricas em benzofenonas polipreniladas, diterpenos e flavonóides. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída aos compostos fenólicos, especialmente aos flavonóides (Bankova et al., 1996). Segundo Pereira et al. (2002) os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonóides nas amostras de própolis provenientes do Brasil, o que poderia explicar a ausência da atividade fungistática observada em nosso trabalho, pois a amostra de própolis utilizada apresentou um baixo teor de flavonóides (Pereira et al., 1999). Outro fator que a ser considerado é o método de extração utilizado (microondas), que poderia promover alteração na estrutura química dos

componentes do extrato. No entanto, o mesmo teor de flavonóides foi encontrado em extratos preparados em forno microondas e em condições farmacopéicas (dados não mostrados), o que sustenta a hipótese da ausência de atividade fungistática observada estar relacionada à composição química da própria própolis. Tal efeito contudo, não compromete o objetivo desejado, a avaliação fototóxica, e sim fornece mais uma informação sobre o extrato.

Os resultados obtidos tanto os ensaios microbiológicos como os ensaios “in vivo” demonstraram a ausência de atividade fototóxica para os extratos em análise, nas concentrações avaliadas. Estes dados indicam também que a metodologia *in vitro* empregada representa uma alternativa a ser utilizada na pré-avaliação de fototoxicidade de substâncias e extratos, sem a necessidade de emprego de animais.

O teste de Ames é mundialmente aceito como um teste padrão para identificação de substâncias que podem produzir danos que gerem mutações gênicas, e é empregado como um *screening* inicial para determinação do potencial mutagênico. É reconhecido que algumas substâncias como aminas aromáticas ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são biologicamente inativos, entretanto seus metabólitos são formas ativas. Para detecção destes metabólitos é adicionado ao teste de Ames um sistema de ativação metabólica. Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares, pois foram realizados sem a adição de um sistema de metabolização.

Na literatura há trabalhos com as principais classes químicas presentes nos extratos em estudo. Chen & Chung (2000) encontraram resultados semelhantes para o ácido tânico e compostos correlatos nas cepas TA98 e TA100, para ensaios com e sem ativação metabólica. Entretanto, é reconhecido que os taninos podem formar complexos com proteínas e precipitar as enzimas do sistema de metabolização gerando resultados falso positivos. Um método alternativo empregando um sistema de células humanas do tipo Hep G2, realizado por Dauer et al. (2003) mostrou que a catequina e os taninos do *Hamamelis virginiana* L. exibem um efeito protetor e sugeriu um efeito antimutagênico dos taninos.

Estudos com flavonóides, classe largamente encontrada nos extratos da própolis, demonstraram que alguns compostos como a apigenina, isohamnetina e luteolina não apresentam mutagenicidade frente ao teste de Ames, enquanto que quercetina e ramnetina apresentaram atividade mutagênica. Estes resultados estão relacionados a diferenças estruturais das moléculas de flavonóides, especialmente o grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxila em um dos anéis aromáticos da estrutura flavonoídica (Czeczot et al., 1990; Edennharder & Tang, 1997). Estudos com antraquinonas demonstram que esta classe apresenta um potencial efeito carcinogênico quando administrado oralmente (Mori et al., 1990). Wamer et al. (2003) avaliaram a atividade fotobiológica de aloe emodina e aloina A em cultura de células de fibroblastos humanos e observaram efeitos citotóxicos e danos oxidativos no DNA

e RNA. Estes efeitos foram gerados pela excitação da aloe emodina pela radiação UV. A aloina não foi citotóxica, entretanto os fibroblastos da pele foram capazes de metabolizar aloina a aloe emodina.

Os nossos resultados confrontados com os dados da literatura demonstram a necessidade de investigações mais profundas quanto à ação de diferentes extratos vegetais, assim como mostram que se faz necessário um maior rigor na utilização destes extratos em preparações farmacêuticas e cosméticas. Além disso, fica evidenciada a importância da realização de testes preliminares tanto de mutagenicidade quanto de fototoxicidade na rotina do controle de qualidade destes produtos.

Os ensaios de mutagenicidade realizados foram somente um *screening* primário frente as quatro cepas, sendo importante o ensaio de metabolização (S9) que fornecerá importantes informações quanto ao processo mutagênico e que é alvo de investigação futura.

A levedura *S. cerevisiae* mostrou resultados semelhantes a *C. albicans* com a vantagem de não apresentar infectividade e patogenicidade em seres humanos, o que garante uma maior seguridade na utilização e manipulação durante o ensaio.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Hélio de Mattos Alves (Faculdade de Farmácia, UFRJ) pelo fornecimento da amostra de *Aloe* spp., ao Dr. José Luiz Mazzei da Costa (Instituto de Biologia, UERJ) pela ajuda estatística, ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ e ao INCQS, FIOCRUZ pela doação das cepas de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, respectivamente. Este trabalho foi financiado pelo CNPq, FAPERJ e CEPG-UFRJ.

## ABSTRACT

*Evaluation of phototoxic and mutagenic activity of propolis, Aloe spp. and Hamamelis virginiana extracts*

**The use of vegetable extracts in pharmaceutical and, especially, cosmetic formulations has increased considerably in the last decade. Nevertheless, there have been few reports examining phototoxic and mutagenic activities of these extracts. This article describes research carried out on the phototoxic and mutagenic action of fluid and dry extracts of propolis, *Aloe* spp. and *Hamamelis virginiana*. Microbiological assays with strains of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, as well as biological assays employing albino short-hair guinea pigs, were used to assess phototoxicity of the extracts. Ethanol extracts of *Ruta graveolens* leaves and *Citrus* spp. fruits pel, and also 8-methoxypsoralen (standard synthetic drug), were employed as positive controls for both tests. Mutagenic activity was evaluated by the Ames test, using four standard *Salmonella typhimurium*, with 4-nitroquinoline oxide as positive**

**control. None of the extracts under study showed phototoxicity to the yeasts or the animals; neither was any mutagenic activity detected, suggesting that these biological products are safe for use. Moreover, the dry extract of witch-hazel showed signs of fungicidal or fungistatic activity. Results of the phototoxicity assays with *S. cerevisiae* also demonstrated that this microorganism can be employed in an efficient screening test procedure for phototoxic activity of drugs and vegetable extracts.**

*Keywords:* *Aloe* spp., *Hamamelis virginiana*, propolis, phototoxicity, mutagenicity.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* 1994; 57(5): 644-7.
- Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1995; 54c: 167-72.
- Bankova V, Marcucci MC, Simova S, Nikolova N, Kujumgiev A, Popov S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1996; 50c: 277-80.
- Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin M, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 1998; 29: 361-7.
- Bankova V, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
- Basnet P, Matsuno T, Neidlein R. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1997; 52 C: 828-33.
- Buehler EV, Newmann EA, Parker R. Use of the occlusive patch to evaluate the photosensitive properties of chemicals in guinea pigs. *Food Chem Toxicol* 1985; 23 (7): 689-94.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347-63.
- Cafarchia C, de Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini, V. Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia* 1999; 41(4): 587-90.
- Castaldo S, Capasso F. Própolis: an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 73 (Suppl 1): S1-S6.
- Chen S, Chung K. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 1-5.
- Collin L, Gagnon A. Huiles essentielles et extraits "micro-ondes". *Parf Cosm Aromes* 1991; 97: 105-12.
- Costa AF. Fármacos com Heterosídeos Antracênicos. In: Costa AF. *Farmacognosia*. 3<sup>rd</sup> ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1970. v.2. p. 225- 74.
- Costa AF. *Farmacognosia*. 4<sup>th</sup>. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v.1, 1031p.
- Czeczot H, Tudek B, Kusztełek J, Szymczyk T, Dobrowolska B, Glinkowska G, Malinowski J, Htrzelecka H. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutat Res* 1990; 240: 209-16.
- Daniels F Jr. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J Invest Dermatol* 1985; 44: 259-63.
- Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmüller S, Mersch-Sundermann V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry* 2003; 63: 199-207.
- Dupuis G, Benezra C. *Allergic contact dermatitis to simple chemicals. A Molecular Approach*. New York: Marcel Dekker. 1982. 750 p.
- Duwiejua M, Zeitlin IJ, Waterman PG, Gray AI. Anti-inflammatory activity of *Polygonum bistorta*, *Guaiaecum officinale* and *Hamamelis virginiana* in rats. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(4): 286-90.
- Edenharder R, Tang X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 357-72.
- Epstein JH. Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg* 1999; 18(4): 274-84.
- Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60(2): 59-84.
- Hegazi AG, Abd El, Hady FK, Abd Allah, FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. A. *Z Naturforsch* 2000; 55c: 70-5.
- Hughes-Formella BJ, Bohnsack K, Rippke F, Bennner G, Rudolph M, Tausch I, Gassmueller J. Anti-inflammatory effect of hamamelis lotion in a UVB erythema test. *Dermatology* 1998; 196: 316-22.
- Hughes- Formella BJ, Filbry A, Gassmueller J, Rippke F. Anti-inflammatory efficacy of topical preparation with 10% hamamelis distillate in a UVB erythema test. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15(2): 125-32.

- Korting HC, Korting-Schäfer M, Hart H, Laux P, Schmid M. Anti-inflammatory activity of hamamelis distillate applied topically to the skin. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 44: 315-8.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235-40.
- Lee CK, Han SS, Shin KY, Chung HM, Park IY, Lee KS, Kim SY. Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of contact hypersensitivity by *Aloe vera* gel components. *Int J Immunopharmacol* 1999; 19: 303-10.
- Lovell, CR. *Plants and the Skin*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1993. 272p.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-15.
- Masaki H, Atsumi T, Sakarai H. Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB irradiation. *J Dermatol Sci*, 1995; 10 (1): 25-34.
- Metzner J, Shneideweind EM, Friedrich E. Effects of propolis and pinocembrin on yeast. *Pharmazie* 1977; 32(11): 730.
- Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1972. 295p.
- Mori H, Yoshimi N, Iwat H, Mori Y, Hara A, Tanaka T, Kawai K. Carcinogenicity of naturally occurring 1-hydroxyanthraquinone in rats: induction of large bowel, liver and stomach neoplasms. *Carcinogenesis* 1990; 11(5): 799-802.
- Pereira AS, Ramos, MFS, dos Santos ESC, Dias PCM, Santos EP, da Silva JFM, Cardoso JN, Aquino Neto FR. Study of Propolis by high temperature resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Z Naturforsch* 1999; 54c: 395-400.
- Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto, FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas. *Química Nova* 2002; 25(2): 321-6.
- Programa nacional do controle de câncer de pele. Available at: <http://www.sbd.org.br/campanha/sobre.html>. Accessed December 16, 2004.
- Ramos MFS, Santos EP, Bizarri CHB, Padilha MRS, Duarte HM, Alves HM. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *Int J Cosmet Sci* 1996; 18: 87-101.
- Rossi A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Saubetin L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia* 2002; 73 (Suppl. 1): S30-S37.
- Tenan MN, Ortiz CH, Dellamora-Ortiz, GM, Mattoon JR, Panek, AD. Relationships between mutations affecting protein kinase and accumulation of energy reserves in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 1985; 26: 31-7
- Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res* 1996; 10: 335-6.
- Vogel HJ, Bonner, DM. Acetylornithinase of *Echerichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 1956; 218:97-106.
- Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts. II. Photodynamic activities. *Z. Naturforsch* 1993; 48c: 858-62.
- Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes. *Phytomedicine* 2000; 7:1-6.
- Wamer WG, Vath P, Falvey DE. In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(2): 233-42.