

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA  
APLICADA



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DAS  
PARTES AÉREAS DE *Pterocaulon polystachyum* DC (ASTERACEAE)

*Dissertação para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Toxicologia  
Aplicada*

**GABRIELA REGNER**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Patrícia Pereira**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Jaqueline Nascimento Picada**

**CANOAS**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

R341a Regner, Gabriela  
Avaliação da atividade toxicológica do extrato de hexânico  
das partes  
aereas de *Pterocaulon Polystachym* DC (Asteraceae)  
[manuscrito] /  
Gabriela Regner. – 2009.  
69 f.  
  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Luterana do Brasil,  
Pós-Graduação  
em Genética e Toxicologia Aplicada, 2009.  
  
Orientação: Profa. Dra. Patrícia Pereira.

Catálogo: Bibliotecária: Cátia S. Garcia CRB 10/1243

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações dos Laboratórios de Farmacologia e Toxicologia, Genética Toxicológica e Fitoquímica da ULBRA, além do Laboratório de Farmacognosia da UFRGS; sendo financiado pela ULBRA e FAPERGS – ‘Programa CASADINHO’.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da Universidade Luterana do Brasil, segundo protocolo 2007-014A (Anexo 01).

## AGRADECIMENTOS

À professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Pereira pela orientação, amizade e confiança, pelas oportunidades e principalmente por acreditar em nossa proposta...Mesmo quando algumas 'pedrinhas' apareciam em nosso caminho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Picada por nortear as análises que volta e meia 'me apavoravam'...Fizeste com que eu ficasse muito mais tranqüila.

Ao professor Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz pelas idéias, pelo incentivo e oportunidade de contar com seu auxílio nas atividades laboratoriais.

À professora Dr<sup>a</sup>. Gilsane Von Poser pela cooperação, pelas coletas, por abrir as portas de seu laboratório e ceder espaço para iniciar os trabalhos, pelos artigos, fotos, idéias, materiais, e-mails... por nos emprestar as bolsistas 'gremistas' Gabriela e Raquel, que me acolheram e orientaram na preparação dos extratos.

À professora Elenir Wiiland, por tornar possível o que parecia não o ser... Obrigada pela dedicação e contribuição.

À professora Mariângela Allgayer por auxiliar nas pesquisas bioquímicas, cedendo seus bolsistas para o engrandecimento do trabalho.

Aos bolsistas Rafael Gomes Von Borowski, Janaína Giancesini, Shandale Cappelari, Vivian Kahl, Juliane Garcia Semedo e Fabiana Silveira não apenas pela ajuda, mas por serem peças essenciais para a realização deste trabalho.

Às funcionárias e amigas, Carla, Roberta e Renata por todo auxílio material e emocional, além dos momentos de diversão e das lembranças dos bons tempos...

Ao meu marido Alex, pelos sacrifícios, pela compreensão, pelo carinho e palavras dispensadas naqueles momentos em que vi a 'coisa preta'.

A toda minha família e meus pais, Pedro e Dirce, pelo incentivo incondicional para minha realização pessoal e profissional, pelo amor e pela certeza do apoio perene.

E, não esquecendo... Meus compreensivos e companheiros colegas do Sesi Farmácia 061. Grata pela ajuda de todos!

Muito obrigada!

## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	04
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	05
<b>RESUMO</b> .....	06
<b>ABSTRACT</b> .....	07
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	08
<b>1. A FAMÍLIA Asteraceae</b> .....	11
1.1 <i>Pterocaulon polystachyum</i> DC .....	14
1.2 Constituintes químicos de <i>Pterocaulon ssp</i> .....	15
1.3 Propriedades biológicas de <i>Pterocaulon ssp</i> .....	20
<b>2. ENSAIOS DE TOXICIDADE</b> .....	23
2.1 Estudos de Toxicidade Aguda .....	25
2.2 Toxicidade de Doses Repetidas (Subaguda) .....	26
2.3 Avaliação da atividade genotóxica .....	28
2.3.1 Teste cometa .....	28
2.3.2 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos .....	31
<b>II - OBJETIVOS</b> .....	33
1. Objetivo Geral .....	33
2. Objetivos Específicos .....	33
<b>III - ARTIGO</b> .....	34
“Evaluation of toxicological parameters of <i>Pterocaulon polystachyum</i> hexanic extract” .....	35
<b>IV - DISCUSSÃO GERAL</b> .....	58
<b>V - CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	62
<b>VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63

## LISTA DE FIGURAS

### I - INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.</b> <i>Pterocaulon polystachyum</i> .....	15
<b>Figura 2.</b> Imagens representativas de células cometa, das classes 0 a 4 .....	31
<b>Figura 3.</b> Origem do micronúcleo, a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro .....	32
<b>Figura 4.</b> Eritrócito policromático (EPC) micronucleado (a), sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático (ENC) sem micronúcleo (c) .....	32

### III - ARTIGO

<b>Figure 1.</b> Effect of oral <i>Pterocaulon polystachyum</i> hexanic extract on the animal weights .....	53
<b>Figure 2.</b> Effect of <i>Pterocaulon polystachyum</i> hexanic extract after acute treatment in blood (A1: male; A2: female), liver (B1: male; B2: female) and kidney (C1: male; C2: female) as evaluated by the comet assay .....	54
<b>Figure 3.</b> Effect of <i>Pterocaulon polystachyum</i> hexanic extract after subacute treatment in blood (A1: male; A2: female), liver (B1: male; B2: female) and kidney (C1: male; C2: female) as evaluated by the comet assay .....	55
<b>Figure 4.</b> Effect of different treatments under hystopathological parameters of the liver. (hematoxylin and eosin stained sections) .....	56
<b>Figure 5.</b> Effect of different treatments under hystopathological parameters of the kidney. (hematoxylin and eosin stained sections). .....	57

## LISTA DE TABELAS

### I - INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência das espécies de <i>Pterocaulon</i> na região sul do Brasil, segundo autores e anos de publicação.....	13
<b>Tabela 2.</b> Cumarinas descritas para <i>Pterocaulon polystachyum</i> e elucidação de suas estruturas químicas .....	18
<b>Tabela 3.</b> Resumo das ações biológicas de <i>Pterocaulon ssp</i> .....	22

### III - ARTIGO

<b>Table 1.</b> Blood chemistry values of mice in acute toxicity of the hexanic extract from the aerial parts of <i>Pterocaulon polystachyum</i> .....	50
<b>Table 2.</b> Blood chemistry values of mice in subacute toxicity of the hexanic extract from the aerial parts of <i>Pterocaulon polystachyum</i> .....	51
<b>Table 3.</b> Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in bone marrow of mice treated with <i>P. polystachyum</i> hexanic extract .....	52



## RESUMO

Desde os primórdios da existência humana, encontra-se nas plantas diferentes utilidades, dentre elas a que se destina ao seu uso terapêutico. Da mesma forma, utilizam-se plantas medicinais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, como fármacos, o que vem sendo relatado com o passar dos anos. As plantas também são fontes de produtos biologicamente ativos, servindo de modelo para a síntese de grande número de fármacos, atuando no aperfeiçoamento do tratamento de diversas patologias. Utilizada no tratamento de patologias veterinárias popularmente diagnosticadas como “micoses”, a planta *Pterocaulon polystachyum* DC, comumente chamada ‘quitoco’ no Brasil, é uma espécie nativa encontrada no sul do Brasil, bem como no Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. Recentemente, sua atividade antifúngica contra algumas espécies de fungos foi demonstrada. Entretanto, não há estudos que confirmem a segurança desta planta para propósitos terapêuticos. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do extrato hexânico das partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum* em camundongos, após os tratamentos agudo e subagudo, através da avaliação de peso, parâmetros bioquímicos, parâmetros comportamentais e DL50, além de sua genotoxicidade e mutagenicidade através do ensaio cometa e do teste de micronúcleos, respectivamente. Os resultados demonstraram que, após o tratamento agudo, o extrato provocou alterações nos parâmetros bioquímicos, especialmente na função hepática; alterações morfológicas nos tecidos hepático e renal, a causou danos ao DNA no tecido renal, de acordo com o ensaio cometa; não houve mortalidade nem sinais visíveis de letalidade foram observados nos camundongos. Ao término do tratamento subagudo, foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle e tratados nos parâmetros bioquímicos, com maior relevância sobre a função renal; e análise histológica. Os resultados também revelaram diferenças importantes no ensaio cometa, onde o extrato demonstrou ser genotóxico no parênquima renal, para ambos os sexos, o que não foi observado no tecido hepático e no sangue. Em relação ao teste de micronúcleos, o extrato não demonstrou ser mutagênico, ou seja, não foi capaz de induzir mutações cromossômicas, havendo inclusive, uma diminuição no número de micronúcleos nos grupos tratados. Não foi observada morte durante o período de tratamento, portanto não foi possível a determinação da DL50. Finalmente, a investigação da segurança do extrato hexânico das partes aéreas de *P. polystachyum* demonstrou que este é relativamente tóxico, quando administrado oralmente a camundongos, em tratamento agudo ou subagudo, com resultados que revelam toxicidade hepática e renal, assim como genotoxicidade sobre o tecido renal. Contudo, maiores estudos devem ser conduzidos em relação à segurança da administração oral, como também da utilização tópica de formulações contendo extrato hexânico das partes aéreas de *P. polystachyum*, visto que esta via é preferencial para o tratamento de micoses.

## ABSTRACT

For years, the human being is looking for new options of treatments, for different kinds of diseases, specially to treat severe pathologies. One way to find new remedies, is based on traditional knowledge, where plants are used for several purposes. Medicinal plants are sources of bioactive compounds and have been used as models for drugs synthesis. The *Pterocaulon polystachyum* DC, commonly called 'quitoco' in Brazil, is a native specie found in southern Brazil, Paraguay, Uruguay and northeastern Argentina. It is utilized to treat animal problems popularly diagnosed as "mycoses". Afterwards, its antifungal activity against some fungi yeasts was reported. However there are no studies that confirm the safety of this plant for therapeutical purposes. For this reason, the aim of this study was to evaluate the toxic effects of hexanic extract of *Pterocaulon polystachyum* after oral administration in acute and subacute treatments in mice, by evaluating the weight, comportamental and biochemical parameters, as well as the LD50 for this extract. Genotoxic and mutagenic activities were assayed through comet assay and micronucleus test. The results showed that after acute treatment the extract caused alterations in biochemical parameters, specially in kidney; morphological alterations in both tested tissues and was genotoxic in kidney tissue, according to comet assay; neither mortality nor visible signs of lethality was observed in mice. At the end of subacute treatment there were significant differences between control and treated groups regarding the biochemical parameters and tissue analysis. The results also revealed important difference between control and treated groups in comet assay, where the extract showed to cause DNA damage in kidney tissue, for both male and female mice, this injury was not observed in liver and blood tissues. According to results of the micronucleus assay, the extract was not mutagenic, in other words, it was not capable to cause cromossomic mutations, there was even a decrease in the number of micronuclei. No death was observed during the period of treatment, therefore it was not possible to determine LD50. Finally, the investigation of the safety of hexanic extract from aerial parts of *P. polystachyum* showed that it is relatively toxic, when orally administrated, in an acute or subacute treatment, with findings that reveal hepatic and kidney toxicity, as well as genotoxicity in mice. Further studies must be conducted about safety of oral and dermal administration of *P. polystachyum* hexanic extract, because this last route is preferred to treat skin disease, like fungi infections.

## I - INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da existência humana, tem-se encontrado nas plantas diversas utilidades, entre as quais ressalta-se a que se destina ao seu uso terapêutico (AMORIM *et al.*, 2003). Dessa mesma maneira, o uso de plantas medicinais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo (BARREIRO *et al.*, 2004). As plantas são fonte importante de produtos biologicamente ativos, servindo de modelo para a síntese de grande número de fármacos, colaborando, por conseguinte, para o avanço na terapêutica de várias doenças (WALL & WANI, 1996).

O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado, durante o Império Shen Nung, há cerca de 2700 aC.. Dentre as 365 drogas mencionadas no Inventário de Shen Nung, encontram-se espécies como *Ephedra sinica* e *Ricinus communis*, além do ópio de *Papaver somniferum*, espécies estas que fornecem, respectivamente, efedrina, óleo de rícino e morfina, princípios ativos utilizados até os dias atuais para os mesmos propósitos (DAVID *et al.*, 2004).

A utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular, baseada no acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, por diversos grupos étnicos. As observações realizadas até o momento, permitem supor que todas as formações culturais fazem uso de plantas como recurso medicinal (SIMÕES *et al.*, 1998).

No Brasil, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes de outras etnias, constituíram fator importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, em que a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES *et al.*, 1998).

De uso quase exclusivo na terapêutica medicamentosa até a década de 1950, os “remédios vegetais” foram gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos contendo as substâncias ativas deles extraídos, ou seus derivados

sintéticos. A razão mais importante para essa mudança foi o difícil controle de qualidade - químico, físico-químico, farmacológico ou toxicológico – dos extratos vegetais, então utilizados. Em consequência, poucas foram as plantas medicinais estudadas segundo protocolos mais modernos, remontando a maioria das informações disponíveis, à década de 1950, obsoletas, portanto, frente ao estágio atual do conhecimento científico (LAPA *et al.*, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (JUNIOR *et al.*, 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na Resolução-RDC N°48 de 16 de março de 2004, fitoterápico é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

O estudo farmacológico das drogas vegetais – planta inteira ou partes –, além de constituir um campo inesgotável de novos conhecimentos científicos e geradores de riquezas, pode contribuir notavelmente para o aprimoramento da medicina tradicional (SIXEL *et al.*, 2005).

Segundo a OMS, aproximadamente 80% da população mundial utiliza medicamentos à base de produtos naturais no alívio de alguma sintomatologia desagradável. A flora brasileira é muito rica e diversificada, estima-se em cerca de 120 mil espécies, das quais apenas 1% tem sido estudada, sob o ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico. Entre os adeptos da fitoterapia, é comum o pensamento de que as plantas medicinais, de uso tradicional, já foram testadas e homologadas, pelo seu uso prolongado na própria espécie humana. Por isso seriam

“remédios” eficazes e seguros, desprovidos de efeitos adversos observados aos produtos sintéticos, não necessitando da avaliação toxicológica exigida para esse tipo de medicamento (LAPA *et al.*, 2004).

Cabe salientar que a planta medicinal é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, sendo assim, os metabólitos de sua biotransformação poderão ser, em alguns casos, potencialmente tóxicos (LAPA *et al.*, 2004).

## 1. A FAMÍLIA Asteraceae

Difundidas popularmente em diversas regiões do mundo devido aos usos em várias enfermidades, as diferentes espécies de *Pterocaulon*, família Asteraceae, conhecidas como “quitoco” ou “quitoco-amarelo”, necessitam de um estudo mais detalhado.

A família Asteraceae ou Compositae, compreende cerca de 1.500 gêneros e, aproximadamente, 23.000 espécies com ampla distribuição, bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991). A família está dividida em três subfamílias: Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae. No Brasil esta família está representada por aproximadamente 196 gêneros e 1.900 espécies (BARROSO, 1991).

O nome da família deriva da estrutura característica da inflorescência, em capítulos florais (BURKART, 1974; CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991) e é considerada uma das famílias mais numerosas e evoluídas do reino vegetal (OLIVEIRA, 1993).

Na definição das características da família, segundo CABRERA (1963), o capítulo floral é composto por um receptáculo no qual se inserem as flores, rodeadas por brácteas involucrais. Neste involúcro constam uma ou mais séries de brácteas herbáceas, coriáceas ou escariosas, livres ou soldadas nos seus bordos. O receptáculo pode ser delgado ou carnoso, maciço ou oco, côncavo, plano, convexo ou cônico. A superfície pode ser quase lisa, estando marcada pelas cicatrizes da inserção das flores, podendo estar desnudo ou coberto por tricomas. A flor hermafrodita com corola tubulosa, pentadentada ou pentalobada no limbo, é o tipo de flor que se encontra na parte interior dos capítulos da maioria das espécies de Asteraceae.

Dentre as subfamílias, a mais numerosa é a Asteroideae, na qual as espécies estão distribuídas em 10 tribos, 57 subtribos e 1.135 gêneros. A mais recente reclassificação filogenética desta subfamília elevou para 20 o número de tribos

(PANERO *et al.*, 2002). Pertence a esta subfamília a tribo Plucheeae (BREMER, 1994).

A tribo Plucheeae inclui 28 gêneros e em torno de 220 espécies, freqüentemente encontradas nas Américas do Sul e Central, como também na África, Ásia e Austrália (BREMER, 1994). Os quatro grupos monofiléticos para esta tribo são *Coleocoma*, *Pterocaulon*, *Laggera* e *Pluchea*. O grupo *Pterocaulon* compreende os gêneros *Pterocaulon* Ell., *Neojeffreya* Cabr. e *Stenachaenium* Benth (ANDERBERG, 1991).

Distribuídas em uma área geográfica bicêntrica estão as cerca de 18 espécies do gênero *Pterocaulon*, das quais 12 espécies são encontradas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, e 6 são australianas indo até Nova Caledônia, Indonésia e sudeste da Ásia (CABRERA *et al.*, 1978). No Brasil, são encontradas 11 espécies, dentre as quais 10 encontram-se no Rio Grande do Sul (LIMA, 2006).

O gênero *Pterocaulon* pode ser dividido em quatro seções de acordo com Cabrera e Ragonese (1978). Uma delas, a seção *Monenteles* (exclusivamente australiana) caracteriza-se pela disposição das brácteas involucrais diferenciada em duas regiões. Já as outras seções são americanas e possuem o involúcro de brácteas involucrais imbricadas, sendo as exteriores gradualmente menores. A seção *Pterocaulon* caracteriza-se pela presença de folhas incano-tomentosas na face adaxial, e a seção *Lanatocaulon* possui folhas lanosas em ambas as faces. Já a seção *Pterocaulopsis*, caracteriza-se por não apresentar indumento lanoso ou tomentoso, sendo observado somente tricomas glandulares.

Segundo Cabrera (1974), as espécies do gênero *Pterocaulon* possuem involúcro longo, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caducas com as flores, de receptáculo pequeno, hirsuto ou glabro. Suas flores são dimorfas: as marginais pluriseriadas, femininas, com corolas filiformes truncadas ou com 2-3 dentes no ápice e as centrais são hermafroditas ou masculinas por esterilidade do gineceu, com corola tubulosa estreita, pentadenteada no limbo. As folhas são alternadas, inteiras ou dentadas,

capítulos pequenos, sésseis, dispostos em glomérulos terminais ou em espigas.

Relatos de que as espécies *Pterocaulon angustifolium*, *P. cordobense* e *P. balansae* ocorrem na região sul do Uruguai foram feitos por Rosengurt (1946). *Pterocaulon virgatum* foi acrescentada a estas Lombardo em 1983. No Paraguai são encontradas dez espécies deste gênero, na Venezuela três, em Cuba duas e no Peru foi encontrado somente *P. alopecuroides* (LIMA, 2006). Em um amplo estudo realizado por Freire (1995) na Argentina, acerca da Flora Fanerogâmica daquele país, foi verificada a presença de 10 das 11 espécies sul-americanas. Segundo Barroso (1959) e Angely (1965), no Brasil ocorrem *P. rugosum*, *P. alopecuroides* e *P. balansae* no estado do Rio de Janeiro, já no estado do Paraná, são encontradas aquelas espécies além de *P. angustifolium*. No Rio Grande do Sul e outros estados do sul do Brasil ocorrem 10 espécies do gênero *Pterocaulon*, conforme demonstrado a seguir (tabela 1) (LIMA, 2006).

**Tabela 1.** Ocorrência das espécies de *Pterocaulon* na região sul do Brasil, segundo autores e anos de publicação.

	Malme, 1931	Rambo, 1952	Cabrera, 1974	Cabrera & Ragonese, 1978	Seeliger, 1992	Cabrera e Freire, 1998
<i>P. alopecuroides</i>	-	PR, RS, SC	Sul	PR, RS, SC	-	Sul
<i>P. angustifolium</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	RS	-	Sul
<i>P. balansae</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	PR, RS, SC	-	Sul
<i>P. cordobense</i>	RS	Limite norte do RS	-	RS	-	Sul
<i>P. lorentzii</i>	RS	Limite norte do RS	Sul	PR, RS, SC	RS	Sul
<i>P. polypterum</i>	RS	Limite norte do RS	-I	RS, SC	-	-
<i>P. polystachyum</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	RS, SC	-	Sul
<i>P. purpurascens</i>	-	Limite norte do RS	-	-	RS	-
<i>P. rugosum</i>	-	PR, RS, SC	Sul	PR, SC	-	Sul
<i>P. virgatum</i>	-	PR, RS, SC	-	RS, SC	-	Sul

Debenedetti e colaboradores (1992) relatam que as espécies *P. purpurascens* Malme e *P. virgatum* (L.) DC, são usadas pela população argentina em função de suas propriedades digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picada de serpentes. Já a espécie *P. sphacelatum*, segundo SEMPLE e colaboradores (1998), é utilizada na Austrália, demonstrando ser efetiva no tratamento de infecções respiratórias, irritações oculares e também como inibidora na replicação de poliovírus tipo 1. Na Argentina, de acordo com estudos etnobotânicos, relata-se que as partes aéreas de *P. polystachyum* apresentam tradicional utilização como



repelente de pulgas e moscas e em casos de insolação (DEBENEDETTI *et al.*, 1994).

As plantas conhecidas popularmente como “Quitoco” (*Pterocaulon ssp.*) foram citadas em um estudo realizado no Rio Grande do Sul por sua utilização no tratamento de doenças de pele em animais, diagnosticadas popularmente como micoses (AVANCINI, 2002). A atividade antifúngica de extratos obtidos de algumas espécies deste gênero, dentre elas *Pterocaulon polystachyum*, foi comprovada posteriormente por Stein (2005).

### **1.1 *Pterocaulon polystachyum* DC**

LIMA (2006) caracterizou botanicamente a espécie como uma erva perene lenhosa de 50 a 100 cm de altura, possuindo raiz pivotante, curta e grossa da qual partem delgadas raízes secundárias. Tem caule simples densamente ramificado no ápice, folhoso até a inflorescência, com tricomas glandulares curtos e densos, apresentando um aspecto pubescente-aveludado. As folhas estão dispostas muito próximo umas das outras, diminuindo de tamanho gradativamente em direção ao ápice. As basais são oval-lanceoladas, concolores, possuem face adaxial e abaxial glandulosas, serradas na margem e ápice agudo. Folhas apicais iguais às basais diferindo apenas no tamanho. Capítulos ordenados em uma capitulescência apical em panícula tirsóide de espigas. Os capítulos são heteromorfos e campanulados, as brácteas são involucrais paucisseriadas, com numerosas flores pistiladas, radiais, filiformes e esbranquiçadas, sem tricomas glandulosos, pápus cerdoso-barbelado e unisseriado. Suas flores são estaminadas no disco, além de tubulosas e esbranquiçadas, com tricomas glandulares nos lacínios, pápus cerdoso-barbelado e unisseriado; o ovário é aparentemente estéril. As cipselas são elipsóides, pentacostadas e pubescentes-glandulosas.



**Figura 1.** *Pterocaulon polystachyum* (Gilsane Von Poser, Guaíba-RS, 2007).

*Pterocaulon polystachyum* é encontrada no Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina, e no sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CABRERA *et al.*, 1978). Neste último, a espécie é comum e pode ser vista na margem das estradas, em campos, borda de matas e no curso de águas, florescendo do final de dezembro a março, e frutificando de fevereiro a abril (LIMA, 2006).

A espécie possui odor forte e característico em função do conteúdo de óleos voláteis encontrados nos tricomas glandulares presentes nas partes aéreas, o que justifica a utilização como repelente de pulgas e moscas (CABRERA *et al.*, 1978).

## **1.2 Constituintes químicos de *Pterocaulon ssp***

Na tribo Plucheeae o único gênero que possui cumarinas é o *Pterocaulon*, no qual 40 cumarinas diferentes foram encontradas previamente em dez espécies. Mais tarde, foram analisadas outras cinco espécies nativas do Sul do Brasil, sendo encontradas cumarinas em todas elas. Isso indica que estes compostos podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos para o gênero. Ressalta-se a

importância da quimiotaxonomia na área farmacêutica, visto que aliada a estudos etnofarmacológicos são aumentadas as possibilidades de se desenvolver novos fármacos. Embora as espécies de *Pterocaulon* exibam outras classes de compostos, as cumarinas são características do gênero. Neste, as cumarinas podem ser di-, tri-, ou tetraoxigenadas, e todas elas são 6,7 oxigenadas (STEIN *et al.*, 2007).

Encontram-se compostos como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, poliacetilenos nas espécies do gênero *Pterocaulon* (VILEGAS *et al.*, 1995), bem como alguns ácidos fenólicos, como ácido caféico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1999). Entretanto, a maioria dos estudos reporta o isolamento de cumarinas simples, todas 6,7 dioxigenadas e consideradas como produtos naturais característicos do gênero.

A partir das partes aéreas das espécies *P. balansae* e *P. lanatum* foram isoladas oito cumarinas, sendo quatro delas novas moléculas denominadas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-5,6-metilenodioxicumarina; 7-(2,3-diidroxil-3-metilbutiloxi)-5,6-metilenodioxicumarina; 2',3'-epoxipuberulina e 2',3'-diidroxipuberulina (MAGALHÃES *et al.*, 1981). Oito poliacetilenos foram isolados e identificados nas espécies *P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum* e *P. rugosum* (MAGALHÃES *et al.*, 1989).

Em estudos realizados por HEEMANN e MIGUEL (2002), foram isolados e caracterizados a partir de *P. interruptum*, cinco compostos: sabandinol (cumarina), quercetina (flavonol), taxifolina 7-O-prenilada (di-hidroflavonol), estigmasterol (esteróide) e 3-O-acetil taraxasterol (esteróide). Do óleo essencial foram caracterizados oito compostos:  $\alpha$ -tujeno; 1,4,6-trimetil-5,6-dihidronaftaleno; 3-heptanona; acetaldeído benzênico; alil ciloexano; carvacrol (metil éter); orto-cimeno e safrol.

Algumas cumarinas isoladas de espécies de *Pterocaulon* podem ser citadas: 6,7-dimetoxi-cumarina de *P. sphacelatum*, e uma cumarina 5,6,7,8-tetraoxigenada, denominada purpurenol de *P. purpurascens* (DEBENEDETTI *et al.*, 1991). Uma revisão estrutural das cumarinas denominadas sabandinol e sabandinona foi realizada por Debenedetti e colaboradores (1997), bem como a descrição de mais duas novas cumarinas denominadas de virgatenol e virgato (DEBENEDETTI *et al.*,

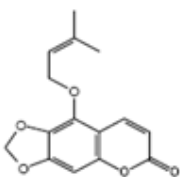
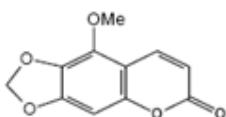
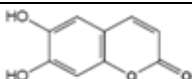
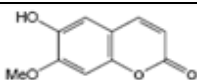
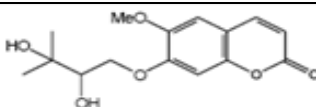
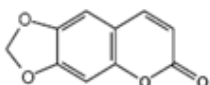
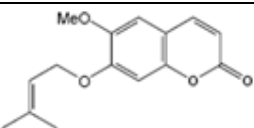
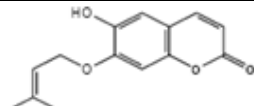
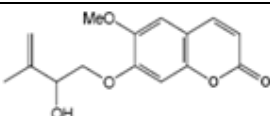
1998). Também foram isoladas de *P. virgatum* as seguintes substâncias: taraxasterol, esqualeno, taxifolina 7-O-prenilada, entre outros compostos (BOHLMANN *et al.*, 1981).

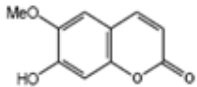
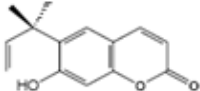
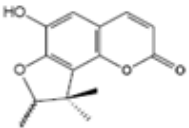
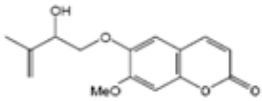
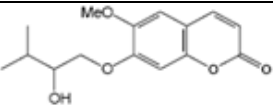
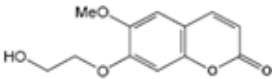
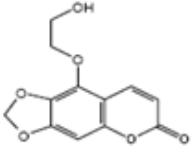
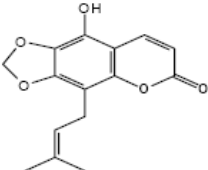
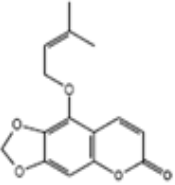
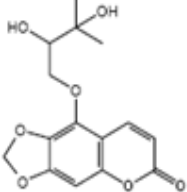
Foram realizados estudos por DEBENEDETTI e colaboradores (1994) com *P. balansae*, resultando no isolamento de 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina e 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina. Posteriormente foi relatado o isolamento da cumarina sabandinol, de dois esteróides (estigmasterol e 3-O-acetiltaraxasterol) e dois flavonóides (quercetina e taxifolina 7-O-prenilada) (HEEMANN, 2006).

Estudos acerca das partes aéreas da espécie *P. alopecuroides* constataram a presença de duas cumarinas oxipreniladas, 7-(2-3dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxi cumarina e 7-(2,3-di-hidroxi-3 metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxi cumarina e um flavonol, 3,5,3',4'-tetra-hidroxi-7-(2,3-eno-3-metilbutioxi)-2,3-dihidroflavonol (VILEGAS *et al.*, 1995).

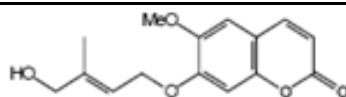
Utilizando as partes aéreas de *P. polystachyum*, VERA e seus colaboradores (2001) descreveram o isolamento e identificação das cumarinas já conhecidas aiapina, isoscooletina, prenetina, prenetina metil éter, virgatenol, obtusinina, 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina, 5-(3,3-dimetilaliloxi)-6,7-metilenodioxycumarina e haplopinol metil éter. Relataram, ainda, que a espécie continha novas cumarinas para a coleção como isovirgatenol, 3-desoxiobtusina, 6-metoxi-7-(2-hidroxietoxi)-cumarina, 5-(2-hidroxietoxi-6,7-metilenodioxycumarina e 5-hidroxi-6,7-metilenodioxycumarina, além de duas outras, citadas como novos produtos naturais, 6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxycumarina e desmetilniexoutina. Também foram isolados desta mesma espécie, por DEBENEDETTI e colaboradores (1994), os produtos quercetina e isoramnetina, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido 4,5-dicafeolquínico, ácido 3,5-dicafeolquínico, ácido 3,4-dicafeolquínico.

**Tabela 2.** Cumarinas descritas para *Pterocaulon polystachyum* e elucidação de suas estruturas químicas.

Substância	Estrutura	Referência
5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Riveiro <i>et al.</i> , 2004
5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001 Riveiro <i>et al.</i> , 2004
Esculetina		Palacios <i>et al.</i> , 1999
Isoescopoletina		Vera <i>et al.</i> , 2001
Obtusina		Vera <i>et al.</i> , 2001
Aiapina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001
7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (preniletina-metil-éter)		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001
Preniletina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001
Virgatenol		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001

Escopoletina		Palacios <i>et al.</i> , 1999
6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxicumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001
Desmetilniexoutina		Vera <i>et al.</i> , 2001
Isovirgatenol		Vera <i>et al.</i> , 2001
3'-desoxiobtusina		Vera <i>et al.</i> , 2001
6-metoxi-7-(2'-hidroxi-2'-etoxi)-cumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001
5-(2'-hidroxi-2'-etoxi)-6,7-metilenodioxicumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001
5-hidroxi-6,7-metilenodioxo-8-(3,3-dimetilalil) cumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001
5-(3,3-dimetilaliloxi)-6,7-metilenodioxicumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001
5-(2',3'-diidroxi-3-metilbutanoxi)-6,7-metilenodioxicumarina		Vera <i>et al.</i> , 2001

Metil eter haplopinol

Vera *et al.*, 2001

### 1.3 Propriedades biológicas de *Pterocaulon ssp*

Plantas da família Asteraceae caracterizam-se por produzir, freqüentemente, poliacetilenos, óleos essenciais e terpenos, sendo que a larga ocorrência de lactonas sesquiterpênicas é a característica química mais marcante da família, sendo conhecidas mais de 2500 estruturas desta classe, a maior parte isolada de Asteraceae (HEEMANN *et al.*, 2004). Muitas dessas lactonas apresentam atividades biológicas como a antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, antiinflamatória, antipirética entre outras (HEEMANN *et al.*, 2004). Algumas são conhecidas por causarem dermatite, enquanto outras inibem a penetração da cercária de *Schistosoma mansoni*. Sugere-se que a presença de óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas sejam responsáveis pelo uso popular contra dores, febres, indigestão e doenças infecciosas (HEEMANN *et al.*, 2004).

A administração de *Pterocaulon virgatum* e *Pluchea sagittalis* em ratos demonstrou o aumento do fluxo biliar, plantas que são popularmente descritas como digestivas, provavelmente em função do elevado conteúdo de ésteres do ácido caféico (por exemplo, ácido 3,4-dicafeolquínico) (MARTINO *et al.*, 1979).

Das 18 espécies do gênero *Pterocaulon*, doze possuem relatos medicinais (MAES *et al.*, 2006). O gênero compreende 11 espécies na Argentina, das quais apenas seis foram investigadas fitoquimicamente (*Pterocaulon virgatum*, *P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. alopecuroides* e *P. purpurascens*). Destas espécies, muitas cumarinas conhecidas e outras novas, com diferentes padrões de oxigenação, foram identificadas (MAES *et al.*, 2006). Inúmeras propriedades biológicas foram descritas para espécies deste gênero, por exemplo, *Pterocaulon virgatum* DC que é endêmica no nordeste argentino, sul do Brasil e Paraguai (MAES *et al.*, 2006), tem suas partes aéreas usadas na medicina tradicional argentina como digestivo, emenagogo, inseticida e contra picadas de cobras (DEBENEDETTI *et al.*,

1999). A partir das partes aéreas desta mesma espécie foram isoladas quatro cumarinas 5,6,7-trioxigenadas, cinco flavonóides, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeolquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1998).

A espécie *Pterocaulon virgatum* (L.) DC é descrita como digestiva (MARTINO *et al.*, 1979), a espécie *Pterocaulon sphacelatum* foi efetiva no tratamento de infecções respiratórias, irritações oculares e também como inibidora na replicação de poliovírus tipo 1 (SEMPLE *et al.*, 1998).

Segundo STEIN e colaboradores (2005), as espécies do gênero *Pterocaulon*, conhecidas popularmente como “quitoco”, são comumente usadas na medicina veterinária do Sul do Brasil para o tratamento de animais diagnosticados com infecções fúngicas. As partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum* DC apresentam utilização na medicina tradicional argentina como repelente de pulgas e moscas e como decocto em casos de insolação (HEEMANN *et al.*, 2004).

MONGELLI e colaboradores (2000) realizaram um estudo investigando o efeito citotóxico e a possível interação do DNA com extratos de plantas medicinais comumente utilizadas na Argentina. Os dados obtidos demonstraram que *Pterocaulon polystachyum* possuiu atividade citotóxica em células de carcinoma epidermóide oral humano sugerindo a presença de compostos que interagem com DNA.

O gênero *Pterocaulon* inclui várias espécies usadas na medicina tradicional em diferentes partes do mundo e as atividades antibiótica (flavonóide e sesquiterpeno), antiviral (flavonóide) e citotóxica (extrato diclorometano) vêm sendo relacionadas a elas (STEIN *et al.*, 2005).



**Tabela 3.** Resumo das ações biológicas de *Pterocaulon ssp* (HEEMANN *et al.*, 2004).

Espécie	Ações biológicas	Autor
<i>Pterocaulon virgatum</i> (L.) DC.	Digestiva	MARTINO <i>et al.</i> , 1979
	Digestiva, emenagoga, inseticida e agente contra picadas de cobras	SORARÚ & BANDONI, em DEBENEDETTI, 1994
<i>Pterocaulon purpurascens</i> Malme	Digestiva, inseticida e agente contra picada de cobras	SORARU E BANDONI, em DEBENEDETTI, 1991
<i>Pterocaulon polystachium</i>	Repelente de pulgas e moscas e em casos de insolação	MARTINEZ, 1981 em DEBENEDETTI, 1994
	Atividade em células de carcinoma epidermóide oral humano e DNA	MONGELLI <i>et al.</i> , 2000
	Atividade contra a larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	CICCIA <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pterocaulon sphacelatum</i> (Labill.) Benth. & Hook f. ex F. Muell	Resfriados, infecções respiratórias, pele sensível, irritações oculares e inibição de 75% de poliovírus tipo 1	SEMPLE <i>et al.</i> , 1998
	Inibição da replicação de poliovírus	SEMPLE <i>et al.</i> , 1999

## 2. ENSAIOS DE TOXICIDADE

Além da curva dose/concentração-resposta é necessário, para se conhecerem os efeitos tóxicos de uma substância, proceder com a realização de testes toxicológicos. Esses testes, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem estabelecer os possíveis efeitos das substâncias em humanos expostos a elas. Com relação a fármacos, os testes de toxicidade sucedem as triagens farmacológicas gerais e são feitos somente com fármacos que mostram efeitos farmacológicos úteis (OGA, 2003).

Em 1937, na Europa, houve intoxicação e morte de centenas de pacientes por dietilenoglicol, solvente utilizado na preparação de sulfanilamida. Registrou-se também, entre 1959 e 1961, a ocorrência de numerosos casos de deformações congênitas em crianças cujas mães haviam tomado talidomida no início de sua gravidez. Diante desses graves acidentes, as Instituições Governamentais, em diversos países, decidiram exigir maior rigor nos controles biológicos de fármacos e medicamentos, quanto a seus efeitos colaterais e tóxicos (OGA, 2003).

No Brasil, a Resolução 1/78 (Diário Oficial 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde estabelece cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda, crônica, teratogenia e embriotoxicidade, além de estudos especiais (OGA, 2003).

Assim, esse conjunto definido de testes deve ser realizado para cada nova substância a ser utilizada ou produzida em larga escala, geralmente acima de 1 tonelada/ano. Entretanto, dependendo do uso da substância, do efeito tóxico produzido pela substância em si, podem-se definir quais os testes que devem ser realizados em situações específicas (OGA, 2003).

A lista de estudos pode variar de um país para outro, mas basicamente inclui os seguintes tópicos (OGA, 2003):

- Informações preliminares;
- Toxicidade aguda;

- Toxicidade sub-crônica (curta duração);
- Toxicidade crônica (longa duração);
- Mutagênese e carcinogênese;
- Reprodução e teratogênese;
- Toxicocinética;
- Efeitos locais sobre a pele e olhos;
- Sensibilização cutânea;
- Ecotoxicidade.

Dois princípios básicos regem os testes descritivos de toxicidade realizados em animais (OGA, 2003; GOODMAN e GILMAN, 1996):

- os efeitos produzidos pelo composto no animal de laboratório devem ocorrer também no homem;
- a exposição de animais de experimentação a altas doses de um agente tóxico é um método válido e necessário para a descoberta dos efeitos danosos ao homem.

Os testes toxicológicos não são planejados para demonstrar que um agente químico é seguro, mas sim para caracterizar que tipo de efeito tóxico uma substância química produz (OGA, 2003).

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana (VALADARES, 2006).

A extrapolação dos resultados obtidos experimentalmente para o homem requer extrema cautela, pois existem diferenças de sensibilidade entre as espécies a serem consideradas e um erro na interpretação dos resultados poderia levar a um grave prejuízo (LEMONICA, 1996). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho não definem exatamente o potencial toxicológico desta espécie em humanos.

## 2.1 Estudos de toxicidade aguda

Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. De modo geral, a dose única é utilizada para determinar-se a potência da droga em casos de ingestão ou envenenamento acidental e as doses múltiplas são usadas para avaliarem-se os efeitos cumulativos. A via oral é indicada, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, considerando-se a exposição humana (OGA, 2003).

Os estudos de toxicidade aguda têm por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50. Este parâmetro, que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população, é útil para identificar a toxicidade relativa da substância. A CL50 (concentração letal média) é utilizada para testes de letalidade no caso de inalação ou para peixes no meio aquático (OGA, 2003).

O teste da DL50 foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias (VALADARES, 2006).

Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) incorporou o Teste da DL50 em suas diretrizes (VALADARES, 2006).

Os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda servem também para conhecer-se o mecanismo de ação da substância, identificar possíveis

órgãos ou sistemas sensíveis e determinar se os efeitos são reversíveis (OGA, 2003).

É importante avaliar-se não apenas a quantidade de animais mortos, mas também o início, a natureza e a duração da intoxicação associada à morte (OGA, 2003).

Esses estudos devem incluir, além das observações clínicas, exames anátomo-patológicos, que auxiliam na caracterização de tecidos e órgãos-alvo (OGA, 2003).

Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (VALADARES, 2006).

## **2.2 Toxicidade de Doses Repetidas (Subaguda)**

Os testes de toxicidade subaguda são realizados para a obtenção de informações sobre a toxicidade das substâncias químicas, após exposições repetidas. Esses estudos podem durar pelo menos 21 dias, mas o tempo mais comum é de 90 dias. É importante porque, às vezes, é o primeiro e o único teste com doses repetidas a ser realizado para determinadas substâncias químicas. Os principais objetivos dos testes de toxicidade subaguda são os de estabelecer os níveis nos quais não se observam os efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os

órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas. Também é importante examinar-se os efeitos após o período de tratamento e determinar se este efeito é devido a um acúmulo da substância ou não. Outro aspecto importante é o de estabelecer se os efeitos tóxicos são reversíveis, determinando-se assim se o período de observação pós-tratamento é necessário ou não. O teste subagudo também pode determinar se um efeito particular, por exemplo, neurotoxicidade, necessita posteriormente de testes específicos (OGA, 2003).

A via de administração é geralmente a oral devendo as eventuais vias de exposição humana serem consideradas. O teste deve ser realizado em pelo menos duas espécies animais, sendo uma não-roedora, utilizando pelo menos três doses (OGA, 2003).

Os animais devem ser examinados pelo menos uma vez ao dia durante todo o experimento, com relação à manifestação de sinais de toxicidade. Os parâmetros mais comuns referem-se a modificações no consumo de ração, de peso, modificações na cor e textura dos pêlos, alterações circulatórias e respiratórias, anormalidades motoras e de comportamento e aumentos macroscópicos de massas de tecidos. Nesses ensaios, sempre deverão estar incluídos um grupo controle negativo, que será tratado da mesma maneira que o grupo teste, menos o agente em teste (OGA, 2003).

Ao término do experimento, os animais sobreviventes serão sacrificados e retirados os órgãos para avaliação anátomo-patológica. Avaliações hematológicas e bioquímicas no sangue são realizadas no final, mas podem também ser feitas antes do início e no meio do ensaio. Exames de urina são também recomendados no início, meio e término do experimento (OGA, 2003).

Os estudos de toxicidade subaguda servem não apenas para caracterizar a relação dose/resposta após administrações repetidas, mas também para fornecer dados para escolha de doses nos estudos de exposição crônica. Os testes de toxicidade subaguda geralmente não avaliam o potencial carcinogênico (OGA, 2003).

## 2.3 Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica

Os testes regulatórios de genética toxicológica se constituem em uma série de testes de mutagenicidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações. Uma mutação é definida como uma mudança na seqüência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são tóxicos para o gene e são então chamados de “genotóxicos”. Uma vez que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de câncer e defeitos ao nascimento, informações sobre o potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente são essenciais para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem. Os testes de genotoxicidade mais utilizados são aqueles que detectam mutações em células germinativas ou somáticas, por exemplo, mutação gênica, associada às alterações na seqüência de nucleotídeos do DNA, ou ao nível cromossômico, como aberrações e micronúcleos (WATERS *et al.*, 1999; MACGREGOR *et al.*, 2000; DEARFIELD *et al.*, 2002; MEDINA, 2006).

Uma vez lesado seu DNA, as células respondem utilizando diferentes estratégias de ação, tais como morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o ciclo celular, e reparação do material genético por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação destes fatores que compõem a resposta a danos genéticos. Os ensaios em células de mamíferos são freqüentemente citados como sendo os mais relevantes para a análise do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (TICE *et al.*, 1994; MULLER e SOFUNI, 2000). Os organismos preferidos para a análise *in vivo* da atividade genotóxica são os roedores (TICE *et al.*, 2000).

### 2.3.1 Teste cometa

O teste Cometa ou *Single-Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) tem sido proposto para estudos de genotoxicidade devido a suas vantagens e peculiaridades, quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. É um teste

que detecta danos primários causados ao DNA e, diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste são passíveis de correção. Desta forma, o teste cometa pode ser utilizado para estudos do reparo do DNA, informando sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite interferir na fidedignidade do processo de reparo. O teste cometa consiste em uma metodologia que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular (HARTMANN *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003; RUNDELL *et al.*, 2003; WIKLUND e AGURELL, 2003).

Esta técnica vem sendo largamente utilizada na indústria, em testes de genotoxicidade *in vitro* (HARTMANN *et al.*, 2003), para detectar agentes suspeitos de induzir danos ao DNA, e foi introduzida primeiramente por Singh *et al.* (1988). Existem algumas limitações para o teste cometa *in vitro* como tempo de exposição e o uso de ativação metabólica (como S9 mix) entre outras restrições dos testes de genética toxicológica *in vitro* (TICE *et al.*, 2000). O sistema de ativação metabólica no teste *in vitro*, não expressa as mesmas condições do teste *in vivo*, pois algumas enzimas específicas do citocromo P450 não estão presentes (TWEATS *et al.*, 2007).

Uma característica interessante do teste cometa é a possibilidade de realização do teste em órgãos, tecidos e populações celulares específicas tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* (WITTE *et al.*, 2007). O resultado positivo *in vivo* indica a genotoxicidade da substância teste no órgão ou tecido e torna-se significativo após verificação inicial do teste *in vitro* (SCHWAAB *et al.*, 2005).

A possibilidade de verificar a atividade genotóxica de substâncias com a influência de fatores farmacocinéticos como a absorção, distribuição, metabolização e excreção consiste em uma grande vantagem do teste cometa *in vivo*. Assim, muitos testes que apresentam resultado positivo *in vitro*, não expressam o mesmo resultado *in vivo*, provavelmente devido a estes fatores (SCHWAAB *et al.*, 2005).

A fim de avaliar o efeito genotóxico diretamente no órgão ou tecido alvo do agente em estudo, o teste cometa foi incorporado à bateria de testes de genotoxicidade *in vivo* (HARTMANN *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2004).

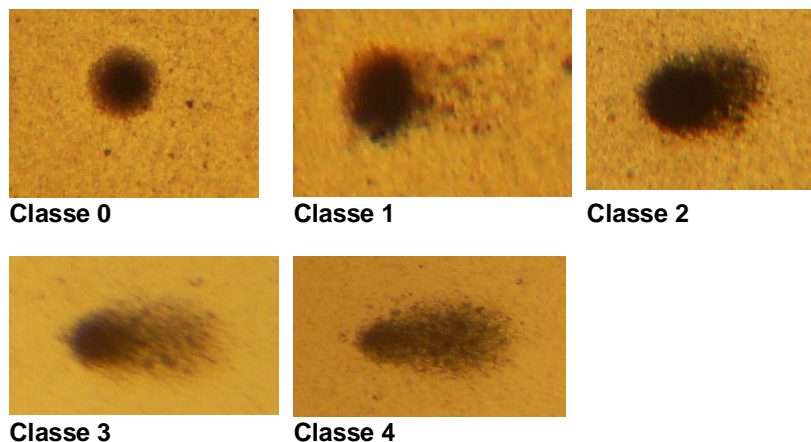


Duzentos e oito produtos químicos foram testados por Sasaki *et al.* (2002) em oito órgãos diferentes de camundongos, e foi demonstrada a eficácia do teste cometa na avaliação da genotoxicidade *in vivo*, bem como na identificação dos tecidos alvo para tumores daqueles produtos.

A versão alcalina do teste cometa, utilizada neste trabalho, detecta quebras de fita simples e dupla, sítios alcali-lábeis e *crosslinks*. As quebras são resultantes de ação direta ou indireta da substância testada sobre o DNA (TICE *et al.*, 2000). O dano indireto é resultado de lesões como metilação e adutos, que, sendo alcalilábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino usado no ensaio. A metodologia do teste consiste inicialmente na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina de microscopia. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear.

Mais tarde, as lâminas são imersas em um tampão de pH 13 (alcalino). O processo propicia o desenovelamento das cadeias de DNA, através rompimento das estruturas secundária e terciária. Após esta etapa, as lâminas são submetidas à eletroforese de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA. As lâminas são coradas com nitrato de prata (TICE *et al.*, 2000; DUEZ *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2007).

O “cometa” é dividido em duas partes para a interpretação dos resultados: “cabeça” e “cauda”. Deste modo, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores. O tamanho e intensidade, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia ou por programas específicos de análise de imagem (TICE *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Imagens representativas de células cometa, das classes 0 a 4 (PEREIRA *et al.*, 2006).

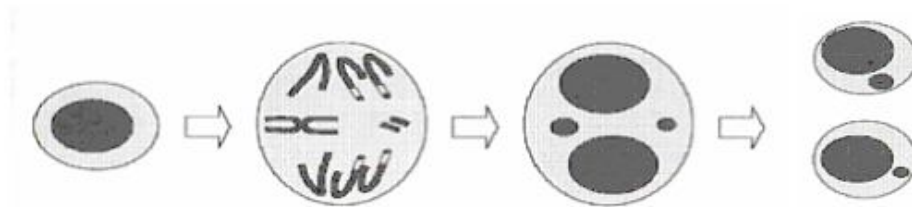
Modificando a técnica do teste, no qual as células ou tecidos de indivíduos tratados com a substância teste, antes de serem colocados em solução de lise, são tratadas com agente genotóxico, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (SZETO *et al.*, 2002), temos o método denominado teste cometa *ex vivo*, o qual é utilizado na determinação da antigenotoxicidade de substâncias com potencial antioxidante, podendo proteger as células dos efeitos genotóxicos induzidos por lesões oxidativas ao DNA. O teste cometa pode vir a integrar as baterias de testes *in vivo/ in vitro* usadas para fins de regulamentação de produtos químicos (TICE *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003; VILLELA *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos

Para avaliação e registro de novos produtos químicos ou farmacêuticos, um dos testes recomendados pelas agências internacionais e instituições governamentais é o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos (CHOY, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003).

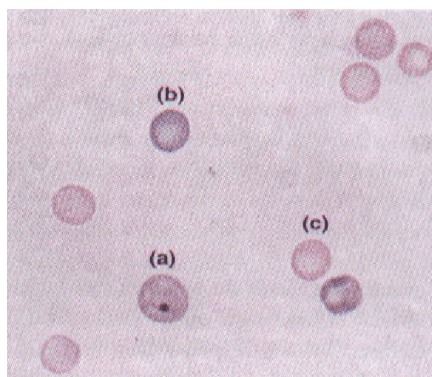
Micronúcleos (MN) consistem em pequenos corpúsculos semelhantes em estrutura ao núcleo, e formados por material cromossômico. Este material cromossômico se perde durante a mitose, em função de quebras ou problemas de fuso. Posterior à separação das cromátides no processo mitótico, são reconstituídos dois núcleos, um em cada pólo. Em torno destes dois conjuntos de cromossomos, a

membrana nuclear é refeita. Contudo, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este acaba por constituir um pequeno núcleo, chamado de micronúcleo (DA SILVA *et al.*, 2003; FENECH, 2005). A frequência de micronúcleos pode elevar-se em resultado de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (DA SILVA *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Origem do micronúcleo, a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (FENECH, 2000).

Utilizados no teste por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar células jovens pela presença de RNA, os eritrócitos são células abundantes na medula óssea e sangue periférico de mamíferos. Os eritrócitos jovens, chamados eritrócitos policromáticos (EPC), contêm RNA ribossomal e diferenciam-se pela coloração com corante para ácidos nucleicos, como por exemplo o Giemsa. Enquanto que os eritrócitos maduros, denominados eritrócitos normocromáticos (ENC), apresentam coloração homogênea por conter somente hemoglobina, os EPCs permanecem estáveis por 24 horas após a expulsão do núcleo, nas células dos mamíferos (DA SILVA *et al.*, 2003; VILELLA *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Eritrócito policromático (EPC) micronucleado (a), sem micronúcleo (b) e eritrócito normocromático (ENC) sem micronúcleo (c) (RIBEIRO, 2003).

## II - OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Investigar o efeito da administração aguda e subaguda de extrato hexânico das partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum* sobre parâmetros toxicológicos, em camundongos, uma vez que este extrato demonstrou possuir atividade antifúngica em estudos anteriores (STEIN *et al.*, 2005).

### 2. Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade aguda e subaguda do extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* em camundongos.

- Realizar provas de função hepática e renal após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum*.

- Efetuar análise macroscópica de fígado e rins após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum*.

- Realizar análise histológica de tecido hepático e renal após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum*.

- Investigar a genotoxicidade do extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* administrado em camundongos (amostras de sangue, tecido hepático e renal), através do ensaio cometa.

- Avaliar a mutagenicidade do extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* através do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos após tratamento subagudo.

### **III - ARTIGO**

#### **Evaluation of toxicological parameters of *Pterocaulon polystachyum* hexanic extract in mice**

(A ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology)

**Evaluation of toxicological parameters of *Pterocaulon polystachyum* hexanic extract in mice**

Gabriela Gregory Regner<sup>a</sup>, Janaína Giancesini<sup>a</sup>, Rafael Gomes Von Borowski<sup>a</sup>, Fabiana Silveira<sup>d</sup>, Juliane Garcia Semedo<sup>b</sup>, Alexandre Ferraz<sup>c</sup>, Elenir Wiilland<sup>f</sup>, Gilsane Von Poser<sup>e</sup>, Mariângela Allgayer<sup>d</sup>, Jaqueline Nascimento Picada<sup>b</sup>, Patrícia Pereira<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Av. Farroupilha, nº 8001, Bairro São José, Canoas/RS, Brasil, CEP: 92425-900.

<sup>b</sup> Laboratório de Genética Toxicológica Aplicada, ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Fitoquímica, ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Veterinário, ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

<sup>e</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>f</sup> Laboratório de Histofisiologia Animal, ULBRA, Canoas, RS, Brasil.

\* Corresponding author. Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, Avenida Farroupilha 8001, Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas/RS, Brasil. Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774 ; fax: +55 51 33167003.

E-mail address: patipere@yahoo.com.br (P.Pereira)

## Abstract

The *Pterocaulon polystachyum* DC, commonly called 'quitoco' in Brazil, is a native specie found in southern Brazil, Paraguay, Uruguay and northeastern Argentina. It is utilized to treat animal problems popularly diagnosed as "mycoses". Afterward, its antifungal activity against some fungi yeasts was reported. However there are no studies that confirm the safety of this plant for therapeutics purposes. For this reason, the aim of this study was to evaluate the toxic effects of hexanic extract of *Pterocaulon polystachyum* after oral administration in acute and subacute treatments in mice, by evaluating the weight, comportamental and biochemical parameters, as well as comet assay and micronucleus assay. The results showed that after acute treatment the extract caused alterations in biochemical parameters, morphological alterations in tissues and was genotoxic, according with comet assay; neither mortality nor visible signs of lethality was seen in mice. At the end of subacute treatment there were important differences between control and treated groups in biochemical parameters and tissue analysis. The results also revealed genotoxicity in kidney tissue, and no mutagenicity. No death was related in the period of treatment. Further studies must be conducted about safety of oral and dermal administration of *P. polystachyum* hexanic extract.

**Keywords:** *Pterocaulon polystachyum*, acute toxicity, subacute toxicity, biochemical, comet assay, micronucleus assay

## 1. Introduction

Nowadays and in the last 30 years, we can observe an alarming increase in dermal and mucosal fungal infections, mainly due to patients who have immunodeficiency or resistance to treatment with some drugs. As an example cancer patients receiving chemotherapy and patients submitted to organ transplantation, being treated with immunosuppressive drugs. HIV-positive patients also contribute to this problem since they have developed resistance to treatment with fluconazole, the most currently used antifungal (Groll *et al.*, 1996; Denning *et al.*, 1997; Portillo *et al.*, 2001; Schmourlo *et al.*, 2005).

The traditional or popular experience regarding the treatment of animal mycoses (ethnoveterinary treatments) is considered nowadays a valuable knowledge for the discovery of new antifungal drugs for human beings, since veterinary and human mycology deals with the same fungal pathogens, with few exceptions (Acha and Szyfres, 2003; McCorkle, 1986; Mathias-Mundy and McCorkle, 1995). Since the available antifungal drugs are ineffective, produce many adverse effects, show recurrence, or lead to the development of resistance human and animal mycoses are not always successfully treated. There is a general consensus that new antifungal agents which overpass these disadvantages are strongly needed (Selitrennikoff, 2001).

Although most antibiotics in clinical use have been obtained from microorganisms, a renewed interest in plant antimicrobials in the last 20 years has been emerged. Only a very small fraction of the known plant species of the whole world has been evaluated for the presence of antifungal compounds. Considering that there is a rapid rate of plant species extinction, many efforts are necessary to collect and to screen plants in order to avoid the lost of an important source of potential leads for the development of novel and environmentally safe antifungal agents.

Avancini (2002) in an ethnoveterinary research, indicated that “quitoco” (*Pterocaulon* species) was useful to treat skin diseases popularly diagnosed as mycoses in animals (although frequently they can be caused by both fungus and bacteria). Afterward, Stein et al. (2005) reported the antifungal activity of some *Pterocaulon* species native to southern Brazil, including *Pterocaulon polystachyum* DC (Asteraceae). However there are no studies that confirm the safety of this plant for therapeutics purposes. For this reason, the aim of this study was to evaluate the toxic effects of *Pterocaulon polystachyum* in mice. The genus *Pterocaulon* encloses various species used in traditional medicine in different parts of the world because of its antibiotic (flavonoid and sesquiterpene) (Macleod and Rasmussen, 1999), antiviral (flavonoid) (Semple et al., 1998, 1999) and cytotoxic (dichloromethane extract) (Mongelli et al., 2000) activities.



## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

A total of two hundred and sixty male and female mice obtained from FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) were used. Animals were kept in Lutheran University of Brazil (ULBRA) vivarium, housed in plastic cages, with “ad libitum” access to water and food, under a 12-h light/dark cycle, and at a constant temperature of  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Each dose group was composed by 20 mice (10 male and 10 female), and the protocol for these experiments was approved by the Animal Ethics Committee of the Lutheran University of Brazil (ULBRA).

### 2.2. Plant material and preparation of plant extracts

Aerial parts of *Pterocaulon polystachyum* DC (Asteraceae) were collected in Guaíba, in April, 2007. The plants were identified by Nelson Matzembacker (Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). Voucher specimen (136584) was deposited in the herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN).

Dried and powdered plant material (aerial parts) of *P. polystachyum* (100g), were extracted by maceration (drug/ solvent ratio=1:10 w/v) with hexane (3×24 h). The extracts were evaporated to dryness under reduced pressure at  $45^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Determination of LD50

In order to determine LD50, healthy mice of both sexes were divided into 5 groups of 20 animals (10 male and 10 female). These animals were orally administrated with single doses of hexanic extract of *P. polystachyum*. The extracts were suspended in vehicle (10% Tween 80 in saline) and administrated by gavage in doses of 250, 500, 1000, 2000 and 3000 mg/kg. Mice were continuously monitored for 1 h after dosing, periodically during the first 24 h, and then daily thereafter, for a total of 14 days. The time at death appeared was recorded. All surviving animals were euthanized after treatment.

### 2.4. Acute toxicity test

Eighty mice were divided into 4 groups of 20 animals each (10 male and 10

female) for the acute treatment. They received single doses of hexanic extract of *P. polystachyum*. The extracts were suspended in vehicle (10% Tween 80 in saline) and administered by gavage in doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The control group received only saline. The general behaviour of the mice was monitored for 1 h after dosing and periodically during 48 h, then they were sacrificed for blood and organs (liver and kidneys) collection.

### 2.5. Subacute toxicity test

Eighty mice were divided into 4 groups of 20 animals each (10 male and 10 female). They were kept under the same conditions as described previously. The first group was given saline and taken as control. The remaining three groups were given orally 100, 200 and 400 mg/kg of hexanic extract of *P. polystachyum* (10% Tween 80 in saline) daily for 4 weeks. All mice were weighted and observed daily for physiological and behavioral changes.

### 2.6. Measurement of biochemical functions

At the end of the acute and subacute treatment, all surviving animals were fasted overnight before sacrifice. Blood samples were collected from each mouse into tubes. The serum was separated from the non-heparinized blood and was assayed for creatinine, total protein, albumin, alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) using Labtest kits.

### 2.7. Genotoxic/ mutagenic activities

#### 2.7.1. Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) with minor modifications (Hartmann and Speit, 1997). After acute and subacute treatment, 5  $\mu$ L of cell suspensions from peripheral blood, liver and kidney were added to 95  $\mu$ L low melting point agarose (LMA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The cells were lysed (2.5M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) and an electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to electrophoreses the DNA. Slides were stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two

replicate slides) were analyzed per animal/group. These cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, without a tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1–2x the diameter of the head; (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head and (5) class 4: comets with minimum head and major fraction of DNA on tail, resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x 4). International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method (Hartmann and Speit, 1997).

#### *2.7.2. Micronucleus assay*

After subacute treatment the femur were excised and the bone marrow flushed into test tubes using a syringe. For the micronucleus (MN) assay, the bone marrow cells from the femur were prepared as recommended by Schmid (1976) and cyclophosphamide was used as a positive control (25mg/Kg). The slides were coded, fixed with methanol and stained with Giemsa solution. Two thousand polychromatic erythrocytes (PCE) from each animal were scored for micronucleus (MN) presence.

#### *2.8. Tissue analysis*

At the end of acute and subacute treatments, immediately after sacrifice, organs such as liver and kidneys were collected for tissue studies. Their macroscopical aspect was observed and histological examinations were performed on the preserved tissues with particular emphasis placed on those that showed gross pathological changes. For the histopathological analysis, samples of the liver and kidney were preserved in 10% formaldehyde for 24 hours and processed following the routine procedure described by Tolosa et al. (2003): the tissues were blocked in paraffin and sections of 7µm thickness were obtained using a Microtome (Microtome RM 2025), stained with hematoxylin and eosin, and evaluated under light microscopy (Leica CME). Photographs were taken using a digital camera (SONY DSC-W1) attached to the microscope.

## 2.9. Statistical analysis

The values from biochemical analysis were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The statistical analysis of data was by analysis of variance (ANOVA) using 5% level of significance. The statistical package used was SPSS 8.0. A one-way ANOVA enabled us to see the significant differences between the values. The Duncan test was used to identify these differences. The values from comet assay and micronucleus test were expressed as described above. However, the statistical package used was Graphpad Prism 2.01 and the Dunnett test used to identify the differences.

## 3. Results

### 3.1. Determination of LD50

No death was recorded in the 14 days of observation period in the male and female animals given 3 g/kg of the hexanic extract of *P. polystachyum* orally. Therefore, it was not possible to determine a value for LD50.

### 3.2. Acute toxicity studies

At the end of the acute treatment there was also no evidence of toxicity, because the animals did not show any changes in the general appearance during the observation period.

### 3.3. Subacute toxicity studies

No deaths or significant changes in general behavior or other physiological activities were observed at any point of the present study.

The body weights of the male and female mice, which were administered an hexanic extract of *P. polystachyum* at 100, 200 or 400 mg/kg doses daily for 28 days, are given in Figure 1. There were no significant differences in the body weights between control and treated animals of both sexes.

### 3.4. Biochemical metabolic parameters

In acute treatment, there were dose-related increases in alanine

aminotransferase (ALT) in male mice, which reached statistical significance ( $p < 0.05$ ) at 100 mg/kg and 400 mg/kg (Table 1). But there were no significant differences in creatinine, total protein, albumin and alkaline phosphatase (ALP) levels between treated and control animals treated with *P. polystachyum* hexanic extract.

There were dose-related increases in subacute treatment in albumin and total protein levels in male mice, which reached statistical significance ( $p < 0.05$ ) at 100 mg/kg and 200 mg/kg (Table 2). But there were no significant differences in creatinine, alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) between treated and control animals treated with *P. polystachyum* hexanic extract.

### 3.5. Comet assay

Figure 2 shows the comet assay results for the acute oral administration of *P. polystachyum* hexanic extract in mice. The extract induced DNA damage in kidney cells from mice treated with 100 mg/kg - only in male - and 400 mg/kg in both male and female mice.

Figure 3 shows the comet assay results for the subacute oral administration of *P. polystachyum* hexanic extract in mice. It is important to stick out that none of the mice died during the study. Statistical analysis indicated that there is a decrease in the DNA damage in the last two doses (200 mg/kg and 400 mg/kg) in blood and liver for both male and female mice. In kidney cells the results showed that the extract was genotoxic, with significant differences between control and 400 mg/kg treated group for male mice and 100 mg/kg and 200mg/kg for female mice.

### 3.6. Micronucleus test

The results obtained from the mouse bone marrow cells after subacute treatment with hexanic extract of *P. polystachyum* are shown in Table 3. There was a significant decrease in MNPCE between control group and treated groups. For both male and female mice, the differences were significant only between control and 400 mg/kg treated group. Per group, the decrease in MNPCE was also significant between control group and 400 mg/kg.

The differences observed in polychromatic and normochromatic erythrocytes

ratio (PCE/NCE) were not significant between control and treated groups in both genders, as well as the difference observed per group.

### 3.7. Tissue analysis

Pathological examinations of the tissues on a gross basis indicated that there were no detectable abnormalities. However the microscopic examination of the liver and kidney tissues (Figure 4 and 5) showed a dose-related difference between control and treated groups in both treatments.

Analysis of liver tissue from animals after acute and subacute treatments with doses of 100, 200 and 400mg/Kg in comparison with control group (Figure 4), showed loss of cordonal organization of hepatocytes, microsteatosis and macrosteatosis and localized inflammatory process. Generalized macrosteatosis was pronounced in animals after acute treatment at doses of 200 and 400mg/Kg.

In kidney tissue from treated animals, when compared to control group (Figure 5) showed lysis of the proximal and distal tubules, and of the thin and thicker segments of Henle's loop; as well as destruction of parietal sheet of Bowman's capsule of renal corpuscles accompanied of glomerulonephritis and inflammatory process in kidney interstitial space.

## 4. Discussion

*Pterocaulon* species are used in a widespread way all around the world. *Pterocaulon polystachyum* belongs to the Asteraceae family and it is commonly known as 'quitoco'. It is popularly used in veterinary medicine to treat skin diseases diagnosed as mycoses in animals

Though the Asteraceae family comprises some of the oldest and most valued medicinal plants (Paulsen, 2002), different genera of this family show toxic compounds like tannic, hydrocyanic, formic and malic acids, rutin and furfural (Duke, 2000).

Since previous reports showed that the strongest antifungal activity was found

in the *n*-hexane and chloroformic extracts, suggesting that coumarins are the active substances, those extracts should be investigated about their toxicity (Stein et al., 2005). This class of natural products with recognized antimicrobial activity is the main constituent of the lipophilic extracts of the *Pterocaulon* species investigated until now (Vera et al., 2001).

Coumarins are frequently found in lipophilic fractions of plants. Although showing antimicrobial activity and being relevant for medicine, they are known for their hepatotoxic effect in laboratory animals. Besides, mice lungs were identified as a target for coumarins in a chronic assay, improving the incidence of alveolar/bronchiolar adenomas and carcinomas (Born et al., 1998).

Coumarin-induced rat liver toxicity is metabolism dependent (Lake, 1984; Lake et al., 1989, 1992a; Peters et al., 1991). Biotransformation of coumarin via cytochromes P450 is a prerequisite for the development of hepatic necrosis in both rat and dog, and injury is thought to result from the epoxidation of coumarin at the 3,4-position to yield a reactive intermediate (Lake et al., 1989).

Our results of the biochemical and genotoxic analysis suggest that acute treatment with hexanic extract of *P. polystachyum* possess harmful effects over the liver and kidneys, although no death was observed. Therefore it was not possible to determine LD50.

The mean body weight gain during subacute treatment was not affected by the extract, suggesting that the plant might not have altered food intake through any mechanisms of appetite suppression. There was also no mortality recorded after the subacute treatment with *P. polystachyum* hexanic extract, indicating that the extract is safe, even at high doses when taken orally.

From the biochemical point of view, results obtained after subacute treatment suggest a possible damage of kidneys activity, only in male mice.

In general, male mice are shown to be more susceptible to the toxic effects of *P. polystachyum* hexanic extract, since there are differences between results

presented for male and female mice. Those gender differences have been already reported by Branch (2008), in a study that deals the gender-selective toxicity of thimerosal, which was more toxic for male than female mice. An hypothesis that may justify such difference is that male and female have different expressions of enzymes from cytochromes P450 (Cai et al., 2003), that are present in the coumarins metabolism.

The microscopical analysis of hepatic and kidney tissues, after both treatments, revealed that the administration of the extract produced damage to the morphology of the related organs. In the liver tissue of mice from treated groups, specially in higher doses, there were observed injuries such as inflammatory process and estheatosi (fatty liver), and in kidney tissue, nephritis, Bowman's capsule damage and Henle's loop injury, could be noted in some samples.

The results of mutagenicity assay showed that the extract did not increase the frequency of micronuclei, then it did not produce any chromosome mutations. However, the results from the comet assay revealed that it induced DNA damage only in kidney cells, in both treatments, and both genders. This activity may be supported by the fact that plants that are used by their toxic substances, which is the case of *P. polystachyum* (insecticide, for example) showed to possess useful cytotoxic compounds, in other words, they have substances that interact with DNA (Mongelli et al., 2000).

In conclusion, the investigation of the safety of *P. polystachyum* hexanic extract showed that it is relatively toxic, when orally administrated, in an acute or subacute treatment, with findings that reveal hepatic and kidney toxicity, as well as genotoxicity.

However, further studies must be conducted in order to prove its safety for topic utilization, which is one of the preferable routes for treat fungi infections.

## References

Acha, P.N., Szyfres, S.B., 2003. Zoonoses and communicable diseases common to



man and animals. In: Bacterioses and Mycoses, vol. I, third ed. Pan American Health Organization Scientific Publication, Washington, 401 pp.

Avancini, C.A.M., 2002. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Born, S.L., Fix, A.S., Caudill, D., Lehman-McKeeman, L.D., 1998. Selective Clara Cell Injury in Mouse Lung Following Acute Administration of Coumarin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 151, 45-56.

Branch, D.R., 2008. Gender-selective toxicity of thimerosal. *Exp. Toxicol. Pathol.* doi:10.1016/j.etp.2008.07.002.

Cai, Y., Dai T., Ao, Y., Konishi, T. Chuang, K.H., Lue Y., Chang, C., Wan, Y.J., 2003. Cytochrome P450 genes are differentially expressed in female and male hepatocyte retinoid X receptor alpha-deficient mice. *Endocrinology* 144 (6): 2311-8.

Denning, D.W., Evans, E.G.V., Kibbler, C.C., Richardson, M.D., Roberts, M.M., Rogers, T.R., Warnock, D.W., Warren, R.E., 1997. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16, 424–436.

Duke, J.A., 2000. Toxins: their toxicity and distribution in plant genera. In: *Handbook of Medicinal Herbs*, pp. 525–568.

Groll, A.H., Shah, P.M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Neubling, G., Huebner, K., 1996. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of Infection* 3, 23–32.

Hartmann, A. and Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.*, 90, 183-188.

Lake, B. G., 1984. Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. *Arch. Toxicol. Suppl.* 7, 16–29.

Lake, B. G., Gray, T. J. B., Evans, J. G., Lewis, D. F. V., Beamand, J. A., and Hue, K. L., 1989. Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97, 311–323.

Macleod, J.K., Rasmussen, H.B., 1999. A hydroxy-caryophyllene from *Pterocaulon serrulatum*. *Phytochemistry* 50, 105–108.

Mathias-Mundy, E., McCorkle, C., 1995. Ethnoveterinary medicine and development: a review of the literature. In: Warren, D.M., Surrerwer, L., Broshenka, D. (Eds.), *The Cultural Dimension of Indigenous Knowledge Systems*. Intermediate Technology Publications, London, pp. 488–498.

- McCorkle, C., 1986. An introduction to ethnoveterinary research and development. *Journal of Ethnobiology* 6, 129–149.
- Mongelli, E., Pampuro, S., Coussio, J., Salomon, H., Ciccía, G., 2000. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 145–151.
- Paulsen E., 2002. Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis* 47, 189–198.
- Peters, M. M. C. G., Walters, D. G., Van Ommen, B., Van Bladeren, P. J., and Lake, B. G., 1991. Effects of inducers of cytochrome P-450 on the metabolism of [3-<sup>14</sup>C]coumarin by rat hepatic microsomes. *Xenobiotica* 21, 499–514.
- Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., Cãñigueral, S., 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 93–98.
- Schmid, W., 1976. The micronucleous test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A. (ed) *Chemical Mutagenesis, Principles and Methods for their Detection*. v. 4. Plenum Press, New York, pp 31-53.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S., 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and foods plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 563–568.
- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2883–2894.
- Semple, S.J., Reynolds, G.D., O'Leary, M.C., Flower, R.L.P., 1998. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 163–172.
- Semple, S.J., Nobbs, S.F., Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P., 1999. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 283–288.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Stein, A. C., Sortino, M., Avancini, C., Zacchino, S., VON Poser, G., 2005. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 99, p. 211-214.
- Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, A.O., Neto, A.G.F., 2003. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2. ed. São Paulo: Ed. Manole. 311p.
- Vera, N., Bardón, A., Catalan, C.A.N., Gedris, T.E., Herz, W., 2001. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica* 67, 674–677.

## Legends

### Figure 1

Effect of oral *Pterocaulon polystachyum* hexanic extract on the animal weights.

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D.,  $n = 10$  (a total of 80 animals). No statistical difference between control and treated groups,  $p > 0.05$ .

### Figure 2

Effect of *Pterocaulon polystachyum* hexanic extract after acute treatment in blood (A1: male; A2: female), liver (B1: male; B2: female) and kidney (C1: male; C2: female) as evaluated by the comet assay. Damage index: can range from 0 (completely undamaged, 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damaged 100  $\times$  4). Statistically significant difference from control group,  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$  (ANOVA, Dunnett test).

### Figure 3

Effect of *Pterocaulon polystachyum* hexanic extract after subacute treatment in blood (A1: male; A2: female), liver (B1: male; B2: female) and kidney (C1: male; C2: female) as evaluated by the comet assay. Damage index: can range from 0 (completely undamaged, 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum damaged 100  $\times$  4). Statistically significant difference from control group,  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$  (ANOVA, Dunnett test).

### Figure 4

Effect of different treatments under histopathological parameters of liver. (hematoxylin and eosin stained sections). (A): Normal liver from control group, showing central vein (short arrow) and hepatocytes with cordonal organization (long arrow). (B): Loss of hepatocytes cordonal organization. (C): Hepatocytes showing micro e macrosteatosis. (D): Macrosteatosis.

### Figure 5

Effect of different treatments under histopathological parameters of kidney. (hematoxylin and eosin stained sections). (E). Normal kidney from control group showing corpuscle with parietal capsule with plan simple epithelium (long arrow) and proximal and distal convoluted tubules (short arrow) with cubic simple epithelium. (F): Damage of parietal sheet of Bowman's capsule of renal corpuscles accompanied of inflammatory process and lysis of the epithelium of proximal and distal tubules. (G): Henle's loop with epithelial lysis. (H): Inflammatory process in interstitial space of kidney.

## Tables and figures

Table 1

Blood chemistry values of mice in acute toxicity of the hexanic extract from the aerial parts of *Pterocaulon polystachyum*.

	Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
<i>Male</i>				
Creatinine (mg/dl)	0,18 ± 5,83	0,10 ± 0,00	0,12 ± 3,74	0,10 ± 0,00
Total protein (g/dl)	7,78 ± 0,56	8,76 ± 1,13	8,80 ± 2,20	10,78 ± 0,52
Albumin (g/dl)	2,44 ± 0,34	3,76 ± 0,95	2,18 ± 0,60	3,64 ± 0,50
ALT (UI/l)	10,60 ± 3,86	25,28 ± 4,69 *	14,80 ± 4,33	26,66 ± 4,54 *
ALP (UI/l)	54,70 ± 14,59	71,54 ± 19,14	43,10 ± 18,03	62,70 ± 18,21
<i>Female</i>				
Creatinine (mg/dl)	0,18 ± 3,74	0,12 ± 2,00	0,12 ± 2,00	0,10 ± 0,00
Total protein (g/dl)	5,68 ± 0,67	7,26 ± 1,19	7,12 ± 0,68	6,96 ± 1,13
Albumin (g/dl)	2,56 ± 0,35	2,76 ± 0,20	3,36 ± 0,43	18,62 ± 0,23
ALT (UI/l)	21,78 ± 5,90	28,06 ± 8,37	31,54 ± 7,37	19,84 ± 1,11
ALP (UI/l)	119,62 ± 22,74	137,02 ± 16,55	96,72 ± 4,93	116,60 ± 18,62

Data are expressed as mean ± S.D.,  $n = 5$  per group (a total of 20 male and 20 female mice).

\* Significantly different from control,  $p \leq 0.05$ .

Table 2

Blood chemistry values of mice in subacute toxicity of the hexanic extract from the aerial parts of *Pterocaulon polystachyum*.

	Control	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
<i>Male</i>				
Creatinine (mg/dl)	0,18 ± 0,18	0,12 ± 5,00	0,18 ± 0,11	0,20 ± 0,15
Total protein (g/dl)	4,18 ± 1,16	5,98 ± 1,37 *	3,86 ± 0,48	5,18 ± 1,06
Albumin (g/dl)	1,18 ± 0,79	2,52 ± 0,78 *	2,88 ± 1,27 *	1,51 ± 0,36
ALT (UI/l)	32,97 ± 12,79	35,22 ± 14,89	35,90 ± 16,39	24,85 ± 10,50
ALP (UI/l)	69,88 ± 26,65	67,38 ± 28,55	73,66 ± 30,42	87,23 ± 17,68
<i>Female</i>				
Creatinine (mg/dl)	0,10 ± 0,00	0,20 ± 0,14	0,14 ± 5,47	0,10 ± 0,00
Total protein (g/dl)	4,36 ± 0,83	5,58 ± 0,84	4,12 ± 1,22	4,65 ± 1,00
Albumin (g/dl)	1,55 ± 0,34	1,60 ± 0,39	2,20 ± 0,36	1,85 ± 0,77
ALT (UI/l)	22,08 ± 3,67	28,58 ± 10,62	23,34 ± 11,47	30,30 ± 12,97
ALP (UI/l)	122,01 ± 51,14	149,20 ± 29,47	108,30 ± 16,07	106,70 ± 49,39

Data are expressed as mean ± S.D.,  $n = 5$  per group (a total of 20 male and 20 female mice).

\* Significantly different from control,  $p \leq 0.05$ .

Table 3

Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in bone marrow of mice treated with *P. polystachyum* hexanic extract.

Group	Sex	Means $\pm$ SD MNPCEs per gender	Means $\pm$ SD MNPCEs per group	PCE/NCE $\pm$ SD per gender	PCE/NCE $\pm$ SD per group
Group	Sex	Means $\pm$ SD MNPCEs per gender	Means $\pm$ SD MNPCEs per group	PCE/NCE $\pm$ SD per gender	PCE/NCE $\pm$ SD per group
Saline	M	3,86 $\pm$ 0,90	2,72 $\pm$ 0,85 (b)	3,44 $\pm$ 0,96	3,25 $\pm$ 0,66 (a)
	F	1,57 $\pm$ 0,79		3,06 $\pm$ 0,36	
100 mg/Kg	M	4,71 $\pm$ 1,50	3,14 $\pm$ 1,14 (b)	2,53 $\pm$ 0,37	2,89 $\pm$ 0,27
	F	1,57 $\pm$ 0,79		3,26 $\pm$ 0,17	
200 mg/Kg	M	2,57 $\pm$ 0,98	1,79 $\pm$ 0,49 (a)	3,04 $\pm$ 0,86	3,12 $\pm$ 0,50
	F	1,00 $\pm$ 0,00		3,21 $\pm$ 0,14	
400 mg/Kg	M	1,43 $\pm$ 0,53 **	0,99 $\pm$ 0,53 **	3,38 $\pm$ 0,67	3,10 $\pm$ 0,48
	F	0,57 $\pm$ 0,53 *		2,83 $\pm$ 0,28	
PC	M	10,8 $\pm$ 3,29**	12,2 $\pm$ 3,51**	1,77 $\pm$ 0,48*	1,82 $\pm$ 0,63*
	F	13,6 $\pm$ 3,72**		1,86 $\pm$ 0,77*	

MNPCEs= micronucleated polychromatic erythrocytes; MN= micronuclei; PCE/NCE= polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio; PC= positive control (25mg/kg of cyclophosphamide).

Statistically different from the control, \* $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

(a) Difference between male and female mice from the same group,  $p < 0.05$ .

(b) Difference between male and female mice from the same group,  $p < 0.01$ .

Figure 1

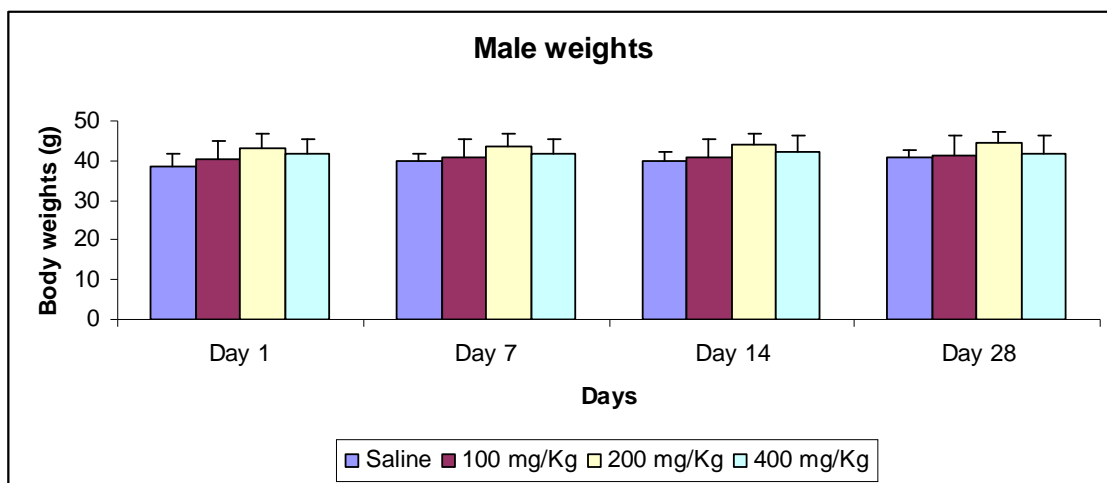
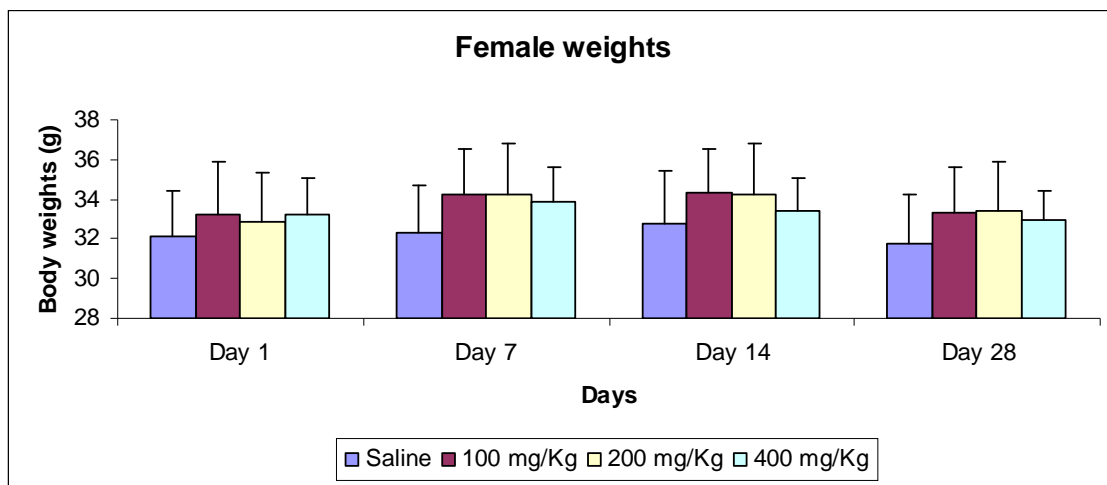




Figure 2

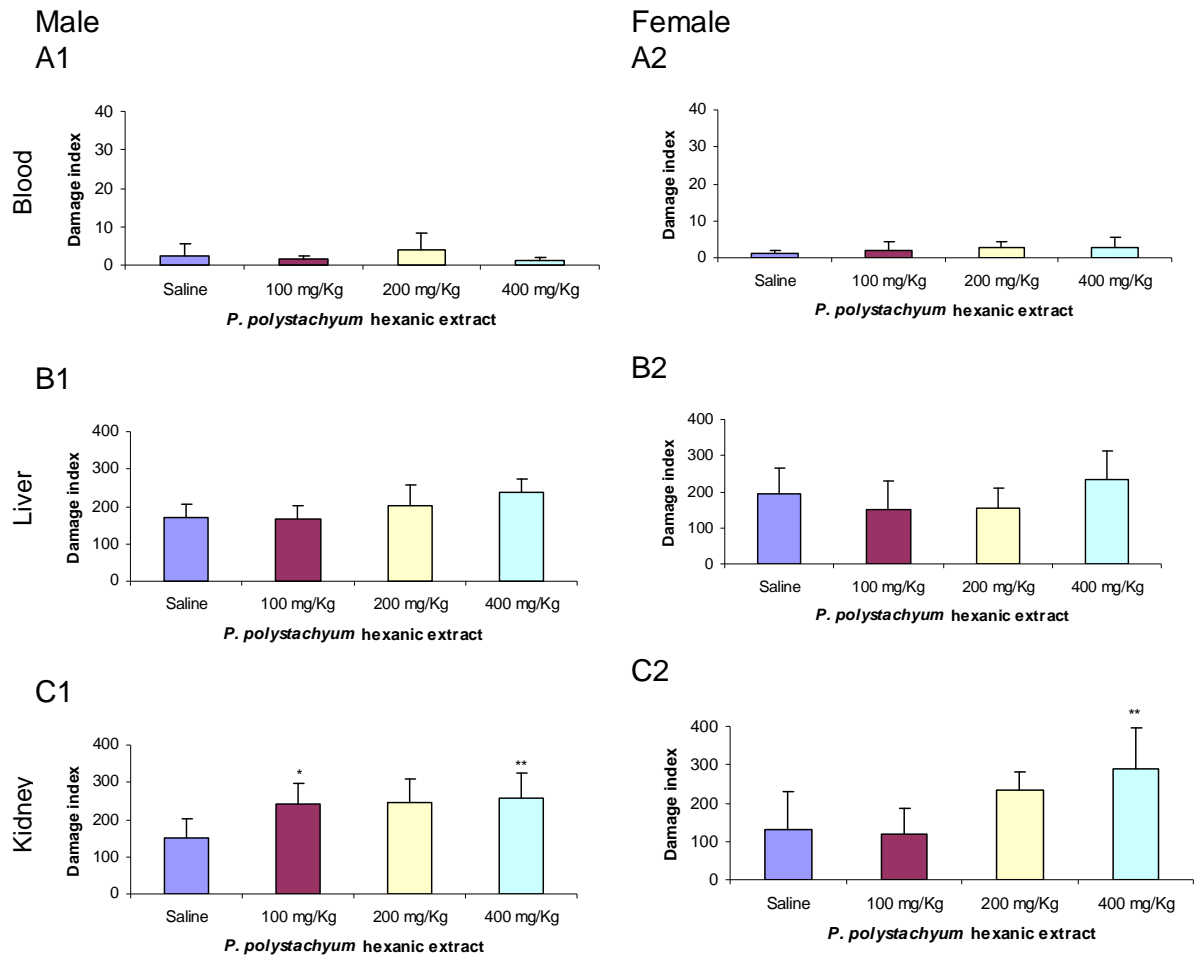
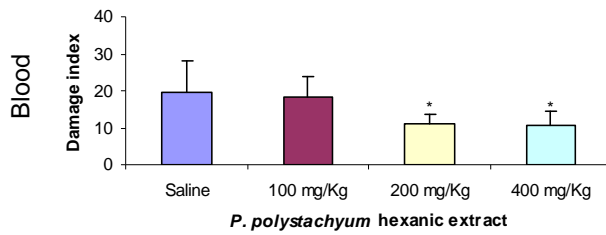
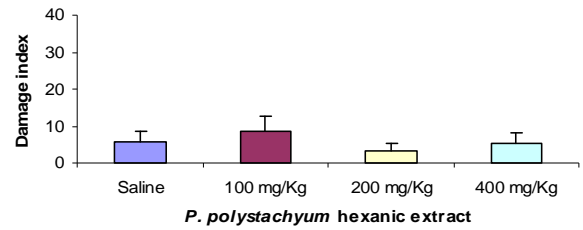
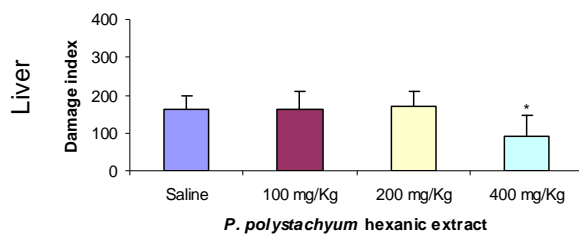


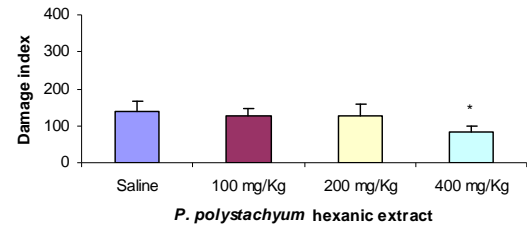
Figure 3

Male  
A1Female  
A2

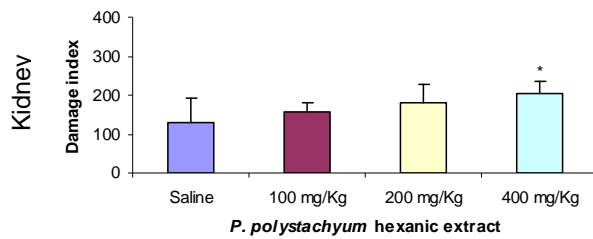
B1



B2



C1



C2

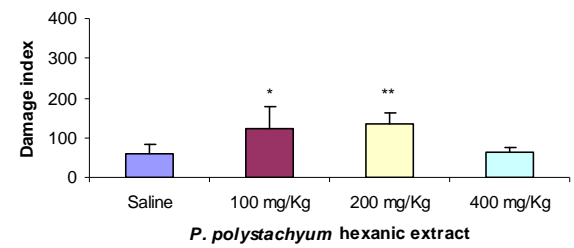


Figure 4

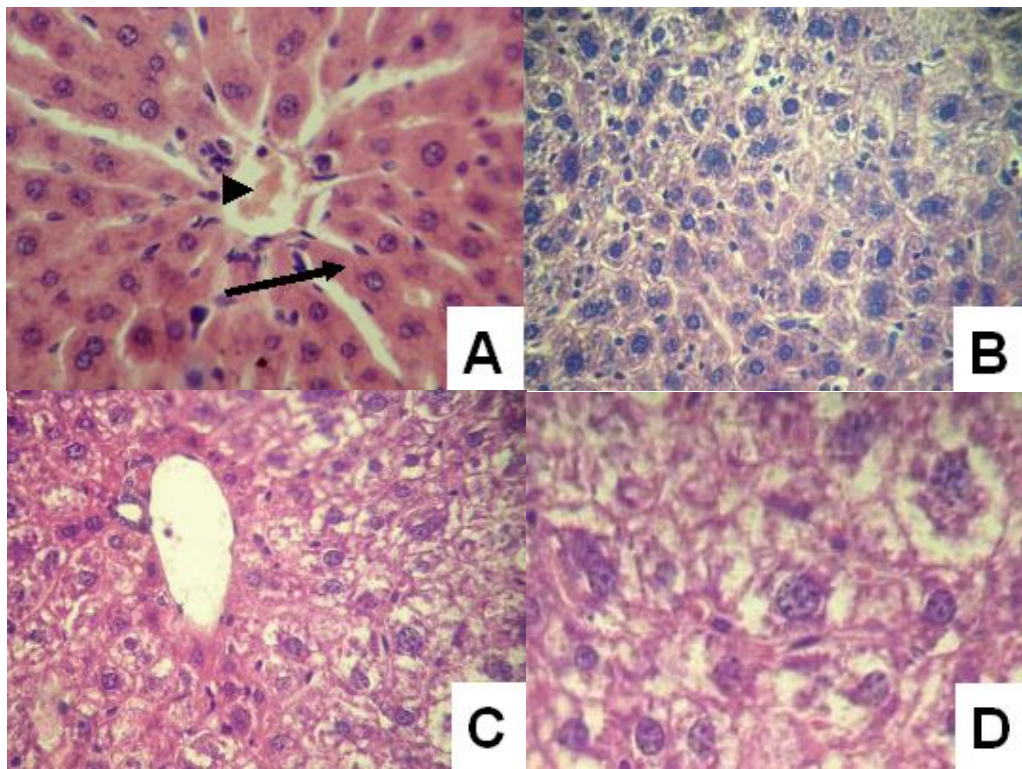
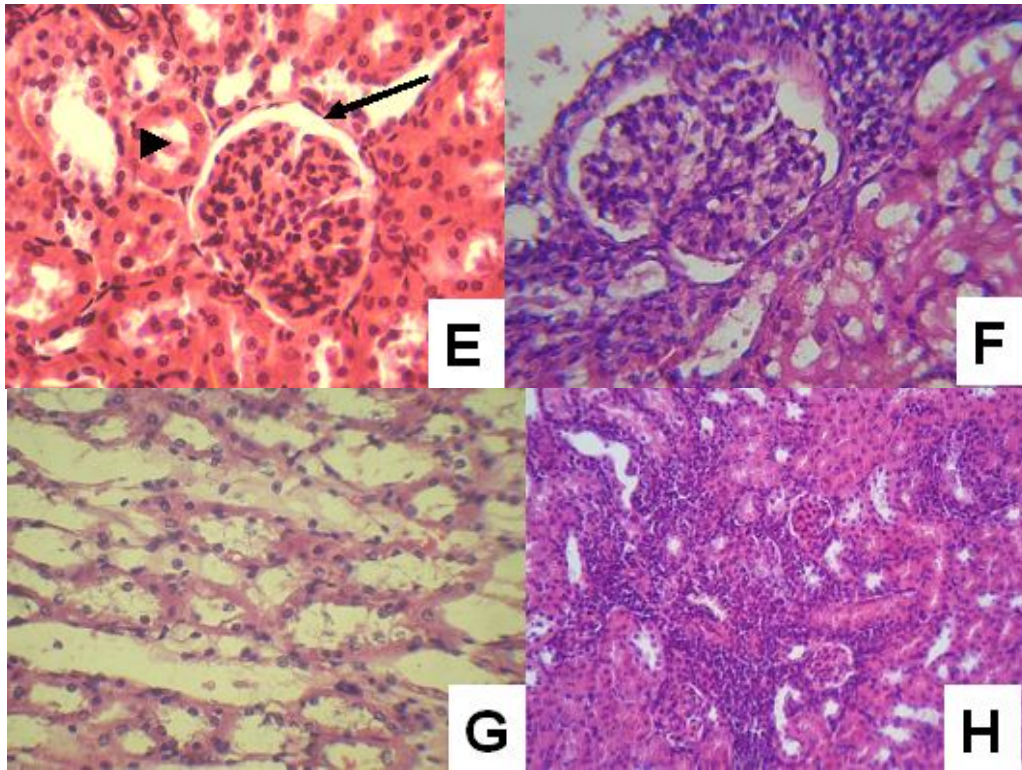


Figure 5



#### IV - DISCUSSÃO GERAL

A utilização das diversas espécies de *Pterocaulon* está bem difundida e é diversa em todo o mundo. A espécie *P. polystachyum* pertencente à família Asteraceae, é conhecida popularmente como 'quitoco', e tradicionalmente utilizada na medicina veterinária do Sul do Brasil para o tratamento de animais diagnosticados com infecções fúngicas (STEIN *et al.*, 2005).

Ainda que a família Asteraceae compreenda algumas das mais antigas e valiosas plantas medicinais, gêneros diferentes desta família demonstraram componentes tóxicos como os ácidos tânico, hidrocianico, fórmico e málico, rutina e furfural (DUKE, 2000).

Uma vez que artigos anteriores demonstraram que a atividade antifúngica mais potente foi encontrada nos extratos hexânico e clorofórmico de *P. polystachyum*, sugerindo que as cumarinas são as substâncias ativas, os extratos deveriam ser investigados em relação a sua toxicidade (STEIN *et al.*, 2005). No Brasil, a Resolução RE Nº90 (16/03/2004) regulamenta os ensaios de toxicidade e dispõe que os testes pré-clínicos prevêm a utilização de uma espécie de mamífero (toxicidade aguda) e duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e outra não-roedora (toxicidade subaguda).

Cumarinas são compostos que possuem atividade antimicrobiana reconhecida e são os principais constituintes dos extratos lipofílicos das espécies de *Pterocaulon* investigadas até agora (VERA *et al.*, 2001). Esta classe de produtos naturais, que é frequentemente encontrada nas frações lipofílicas das plantas, embora demonstre atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos, sendo de grande relevância para a medicina, é um conhecido hepatotóxico em animais de laboratório. Além disso, o pulmão de camundongos foi identificado como órgão-alvo das cumarinas em um ensaio crônico, aumentando a incidência de adenomas e carcinomas

alveolares/bronquiolares (BORN *et al.*, 1998).

A toxicidade hepática induzida pela cumarina em ratos é metabolismo-dependente (LAKE, 1984; LAKE *et al.*, 1989, 1992a; PETERS *et al.*, 1991). A biotransformação da cumarina via citocromo P450 é um pré-requisito para o desenvolvimento de necrose hepática em ratos e cachorros, e o dano, presume-se, resulta da epoxidação da cumarina na posição 3,4 gerando um intermediário reativo (LAKE *et al.*, 1989).

Os resultados obtidos demonstraram que as análises bioquímicas e genotóxicas sugerem que o tratamento agudo com extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* possui efeito deletério sobre o parênquima hepático, bem como o renal, mesmo sem observar sinais claros de toxicidade nem mesmo mortes durante este tratamento, não sendo possível, portanto, a determinação da DL50.

Durante o tratamento subagudo, a média de ganho de peso corporal não foi afetada pelo extrato, sugerindo que a planta não deve ter alterado o consumo de alimentos através de nenhum mecanismo de supressão do apetite. Não houve, também, mortalidade após o tratamento subagudo com extrato hexânico de *P. polystachyum* mesmo em doses altas, quando administrado oralmente.

Do ponto de vista bioquímico, os resultados obtidos após o tratamento subagudo sugerem possível prejuízo da atividade renal, apenas em machos. De maneira geral, camundongos machos demonstraram ser mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do extrato hexânico de *P. polystachyum*, sendo observadas diferenças entre os resultados apresentados para machos e fêmeas.

A diversidade entre gêneros já havia sido relatado por Branch (2008), em um estudo que abordava a toxicidade gênero-seletiva do timerosal, sendo este mais tóxico para camundongos machos do que para fêmeas. Uma hipótese que pode justificar tal diferença é a de que machos e fêmeas possuem diferenças na

expressão de enzimas da família do citocromo P450 (CAI *et al.*, 2003), que estão envolvidas no metabolismo de cumarinas.

A análise microscópica dos tecidos hepático e renal, após os tratamentos, revelou que a administração do extrato produziu prejuízo à morfologia dos órgãos relacionados. No tecido hepático dos animais tratados, especialmente nas doses mais altas, foram observadas lesões como processos inflamatórios e esteatose, já no tecido renal foram observados danos em algumas amostras de animais tratados como nefrite, degeneração da cápsula de Bowman e de alguns segmentos da alça de Henle.

Os resultados demonstraram que o extrato não foi mutagênico, ou seja, não foi capaz de induzir mutações cromossômicas, não aumentando a frequência de micronúcleos em células da medula óssea após o tratamento subagudo. Entretanto, os testes de genotoxicidade revelaram que o extrato produziu danos ao DNA em células renais, tanto no tratamento agudo quanto no subagudo, o que não foi observado no tecido sangüíneo e tecido hepático. Esta atividade pode ser suportada pelo fato de que, plantas que são utilizadas por suas substâncias tóxicas, como é caso de *P. polystachyum* (usada como inseticida, por exemplo) demonstraram possuir compostos citotóxicos úteis, ou seja, possuem compostos que interagem com o DNA (MONGELLI *et al.*, 2000).

Em conclusão, a investigação da segurança do extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* demonstrou que este é relativamente tóxico, quando administrado oralmente, seja de forma aguda ou subaguda, com achados que revelam tanto toxicidade hepática e renal, assim como genotoxicidade no tecido renal.

Visto que o extrato hexânico de *Pterocaulon polystachyum* possui atividade anti-fúngica comprovada através de estudos *in vitro*, atribui-se, provavelmente, esta sua propriedade biológica à presença de cumarinas. Porém, estudos não confirmaram ainda esta hipótese.

Uma vez que ainda não foram reconhecidos os compostos, nem foram elucidados os mecanismos através dos quais a planta produz o efeito anti-fúngico, novos estudos são necessários e devem ser conduzidos a fim de esclarecer tais características, bem como os responsáveis por sua toxicidade.

Tendo sua atividade terapêutica comprovada, deve ser selecionada uma via para utilização terapêutica, seja oral ou tópica. Em função da toxicidade relatada neste trabalho e, uma vez que as formas farmacêuticas para o tratamento de micoses ou infecções fúngicas apresentam-se como cremes ou pomadas, torna-se necessário demonstrar a segurança e eficácia de *Pterocaulon polystachyum* nestas formulações.



## V – CONCLUSÕES FINAIS

- A análise dos resultados demonstra que o extrato hexânico de partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum* foi relativamente tóxico, de maneira geral, após os tratamentos agudo e subagudo em camundongos.

- As provas de função hepática e renal, após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, sugerem que este tem efeito prejudicial sobre a atividade renal dos animais tratados.

- As análises microscópicas dos tecidos hepático e renal, após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, relataram seu potencial para provocar danos à morfologia dos órgãos relacionados..

- Os resultados do teste cometa, realizado após os tratamentos agudo e subagudo com extrato hexânico de partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, utilizando amostras de sangue, tecido hepático e renal, sugerem que este foi genotóxico apenas em células renais de animais submetidos a ambos os tratamentos.

- O teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos, conduzido após o tratamento subagudo com extrato hexânico de partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, revelou que este não foi mutagênico aos animais dos grupos tratados.

## VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM E.L.C., LIMA C.S.A., HIGINO J.S., SILVA L.R.S., ALBUQUERQUE U.P. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. *Infarma*, v. 15, n. 1, p. 66-69, 2003.

ANDERBERG, A.A. Taxonomy and phylogeny of the tribe Plucheeae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 176, p. 75-123, 1991.

ANGELY, J. *Flora Analítica do Paraná*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1965. 728 p.

ANVISA RESOLUÇÃO RDC N° 48 DE 16/03/2004. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>. Acesso em 13/05/2007.

AVANCINI, C.A.M. *Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* cham. e schlecht. – Hypericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”/“sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico*. Porto Alegre, 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BARREIRO E.J., FRAGA C.A.M., ARAÚJO JR J.X. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 147-210, 2004.

BARROSO, G.M. *Flora da cidade do Rio de Janeiro – Compositae*. Rio de Janeiro: Rodriguesia, v. 21-22, n. 33-34, p. 69-147, 1959.

BARROSO, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Editora UFV, v. 3, 1991. 326 p.

BOHLMANN, F., ABRAHAM, W. R., KING, R. M., ROBINSON, H. Thiophene acetylenes and flavonols from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 4, p. 825-827, 1981.

BORN, S.L., FIX, A.S., CAUDILL, D., LEHMAN-MCKEEMAN, L.D. Selective Clara Cell Injury in Mouse Lung Following Acute Administration of Coumarin. *Toxicology and Applied Pharmacology* v. 151, p. 45-56, 1998.

BRANCH, D.R. Gender-selective toxicity of thimerosal. *Exp. Toxicol. Pathol.* DOI:10.1016/j.etp.2008.07.002, 2008.

BREMER, K. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press Inc., 1994. 752 p.

BURKART, A. Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina). *Coléccion Científica del I.N.T.A.*, Buenos Aires, v. 6, p. 106, 1974.

CABRERA, A.L. Flora de la provincia de Buenos Aires. *Colección Científica del I.N.T.A.*, Buenos Aires, v. 4, n. 6, p. 433, 1963.

\_\_\_\_\_. Compositae. In: BURKART, A. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). *Colección Científica del I.N.T.A.*, Buenos Aires, v. 6, n. 6, p. 106-554, 1974.

\_\_\_\_\_, RAGONESE, A.M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). *Darwiniana*, v. 21, n. 24, p. 185-287, 1978.

CAI, Y., DAI T., AO, Y., KONISHI, T. CHUANG, K.H., LUE Y., CHANG, C., WAN, Y.J. Cytochrome P450 genes are differentially expressed in female and male hepatocyte retinoid X receptor alpha-deficient mice. *Endocrinology*, v. 144, n. 6, p. 2311-2318, 2003.

CHOY, W.N. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Nova lorque: Informa Healthcare, 2001. Cap. 5. Regulatory genetic toxicology tests, p.93-113.

CRONQUIST, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Nova lorque: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422 p.

DEARFIELD K.L., CIMINO M.C., MCCARROLL N.E., MAUER I., VALCOVIC L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p.121-135, 2002.

DEBENEDETTI, S.L., NADINIC, E.L., COUSSIO, J.D., DE KIMPE, N., DUPON, J. F., DECLERCQ, J.P. Purpurenol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 30, n.8, p. 2757-2758, 1991.

DEBENEDETTI, S.L., NADINIC, E.L., GOMEZ, M.A., COUSSIO, J.D., DE KIMPE, N., BOYKENS, M. Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 9, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S.L., PALACIOS P.S., WILSON, E.G., COUSSIO, J.D. Polyphenols of *Pterocaulon polystachium*. *Fitoterapia*, v. 65, n. 2, p. 188-189, 1994.

DEBENEDETTI, S.L., DE KIMPE, N., BOEYKENS, M., COUSSIO, J.D., KESTELEYN, B. Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 7, p. 1515-1517, 1997.

DEBENEDETTI, S.L., NADINIC, E.L., COUSSIO, J.D., DE KIMPE, N., BOEYKENS, M. Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 4, p. 707-710, 1998.

DEBENEDETTI S.L., ABBASPOUR TEHRANI K., VAN PUYVELDE L., DE KIMPE N. Isopurpurazol, a coumarin from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 701-703, 1999.

DUEZ, P., DEHON, G., KUMPS, A., DUBOIS, J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*, v. 18, p. 159-166, 2003.

DUKE J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2 ed.. Boca Raton: CRC Press, 2000. Toxins: their toxicity and distribution in plant genera, p. 525-568.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, v. 111, p. 3-32, 2005.

FREIRE, S.E. Asteraceae, Inuleae: *Pterocaulon*. *Flora Fanerogamica Argentina*, v. 14, n. 2, p. 47-52, 1995.

GOODMAN, L.S. e GILMAN A. (Eds.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 1996. p. 49.

HARTMANN, A, AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v.18, N. 1, p. 45-51, 2003.

HARTMANN, A., SCHUMACHER, M., HELBIG, U.P., LOWE, P., SUTER, W., MUELLER, L. Use of alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, v. 19, p. 51-59, 2004.

HEEMANN, A.C.W. e MIGUEL, O.G. Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (ASTERACEAE). *Visão Acadêmica*, v. 3, n. 2, p. 125, 2002.

HEEMANN, A.C.W., MIGUEL, O.G., DALLARMI, M. Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 585-588, 2006.

JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 10 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991. 776p.

JUNIOR, V.F.V., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?

*Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KLAASSEN, C.D. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. In: HARDMAN, J.G. LIMBIRD, J.E. *Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1240-1252. 1996.

LAKE, B.G. Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. *Arch. Toxicol. Suppl.*, v. 7, p. 16–29, 1984.

LAKE, B.G., GRAY, T.J.B., EVANS, J.G., LEWIS, D.F.V., BEAMAND, J.A., HUE, K.L. Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 97, p. 311–323, 1989.

LAPA A.J., SOUCAR C., LIMA-LANDMAN M.T.R., GODINHO R.O., NOGUEIRA T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 147-210, 2004.

LEMONICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 85-94, 1996.

LIMA, L.F.P. *Gênero Pterocaulon Ell. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul: Aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos*. Porto Alegre, 2006. 187p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LOMBARDO, A. *Flora Montevidensis*. Montevideo: Intendência Municipal de Montevideo. T. 2, p. 217-221, 1983.

MACGREGOR, J.T., CASCIANO, D., MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.

MAES D., DEBENEDETTI S., DE KIMPE N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 165-169, 2006.

MAGALHÃES, A.F., MAGALHÃES, E.G., LEITÃO FILHO, H.F., FRIGUETTO, R.T.S., BARROS, S.M.G. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 6, p. 1369-1371, 1981.

MAGALHÃES, A.F., MAGALHÃES, E.G., VILARDES, N.J., LEITÃO FILHO, H.F. Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, v. 28, n. 9, p. 2497-2499, 1989.

MARTINO, V.S., DEBENEDETTI, S.L., COUSSIO, J.D. Caffeoylequinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 2052, 1979.

MEDINA, L.F.C. *Avaliação das atividades bioquímica e genotóxica de*

*aminonaftoquinonas*. Porto Alegre, 2006. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MONGELLI, E., PAMPURO, S., COUSSIO, J., SALOMON, H., CICCIA, G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 145-151, 2000.

MULLER, L. & SOFUNI, T. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 202-205, 2000.

OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 60-63.

OLIVEIRA F., AKISUE, G. *Fundamentos de Farmacobotânica*. São Paulo: Editora Atheneu, 1993. 216p.

PANERO, J.L., FUNK, V.A. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. v. 115, n. 4, p. 909-922, 2002.

PEREIRA, P., OLIVEIRA, P.A., ARDENGHI, P., ROTTA, L., HENRIQUES, J.A.P., PICADA, J.N. Neuropharmacological Analysis of Caffeic Acid in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 99, p. 374-378, 2006.

PETERS, M.M.C.G., WALTERS, D.G., VAN OMMEN, B., VAN BLADEREN, P.J., LAKE, B.G. Effects of inducers of cytochrome P-450 on the metabolism of [3-14C]coumarin by rat hepatic microsomes. *Xenobiotica*, v. 21, p. 499-514, 1991.

RESOLUÇÃO-RE Nº 90, 16/03/2004. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=>. Acesso em 27/05/2007.

RHODEN, E.L., RHODEN, C.R. *Princípios e Técnicas em Experimentação Animal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. 568p.

RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Org). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. 355p.

ROSENGURTT, B. *Estudios sobre praderas naturales del Uruguay*. 5 ed. Montevideo: Rosgal, 1946. Flora de Juan Jackson. p. 347-442.

RUNDELL, M.S., WAGNER, E.D., PLEWA, M.J. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 42, n. 2, p.61-67, 2003.

SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs:

results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, v. 519, p.103-119, 2002.

SCHWAAB, S.B., HARTMANN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, v. 20, p. 245-254, 2005.

SEMPLE, S.J., REYNOLDS, G.D., O'LEARY, M.C., FLOWER, R.L.P. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, p. 163-172, 1998.

SIMÕES C.M.O., MENTZ L.A., SCHENKEL E.P., IRGANG B.E., STEHMANN J.R. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 5 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1998. 173 p.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIXEL P.J., PECINALLI N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. *Infarma*, v. 16, n. 13-14, p. 74-77, 2005.

STEIN, A.C., SORTINO, M., AVANCINI, C., ZACCHINO, S., VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 211-214, 2005.

STEIN, A.C., FRITZ, D., PAIVA LIMA, L.F., MATZENBACHER, N.I., SCHRIPSEMA, J., PIRES, V., SONNET, P., VON POSER, G. Distribution of coumarins in the tribe Plucheeae, genus *Pterocaulon*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 43, n. 6, p. 691-693, 2007.

SZETO, Y.T., COLLINS, A.R., BENZIE, I.F.F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutation Research*, v. 500, n. 1-2, p.31-38, 2002.

TICE, R.R., HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D., HOLDE, H.E., KIRSCH-VILDERS, M., OLESON Jr, F.B., PACCHIEROTTI, F., PRESTON, R.J., ROMAGNA, R., SHIMADA, H., SUTOU, S. & VANNIER, B. Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutation Research*, v. 312, p. 305-312, 1994.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TWEATS, D.J., BLAKEY, D., HELFICH, R.H., JACOBS, A., JACOBSEN, S.D.,

MORITA, T., NOHMI, T., DONOVAN, M.R.O., SASAKI, Y.F., SOFUNI, T., TICE, R. Report of the IWGT working group on strategy interpretation for regulatory in vivo tests. II Identification of in vivo-only positive compounds in bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, v. 627, p.92-105, 2007.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste  $dl_{50}$ ”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VERA, N., BARDÓN, A., CATALAN, C.A.N., GENDRIS, T.E., HERZ, W. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica*, v. 67, p. 674-677, 2001.

VILEGAS, W., BORALLE, N., CABRERA, A., BERNARDI, A.C., POZETTI, G.L., ARANTES, S.F. Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 1017-1019, 1995.

VILLELA, I.V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H.C., SILVEIRA, J.D. Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. (Org). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, p. 147-166, 2003.

WALL, M.E., WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 239-254, 1996.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*, v. 437, p. 21-49, 1999.

WIKLUND, S.J., AGURELL, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 167-175, 2003.

WITTE, I., PLAPPERT, U., WALL, H., HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part III: The comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicological Sciences*, v. 97, p. 21-26, 2007.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)