



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação



***Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae):
Validação para fins Farmacêuticos**

Evani de Lemos Araújo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação

Acanthospermum hispidum DC (Asteraceae):
Validação para fins farmacêuticos

*Tese apresentada como um dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco.*

Evani de Lemos Araújo

Orientação: Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier

Co-orientação: Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau

Recife, outubro de 2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 31 de outubro de 2007.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 31 de outubro de 2007 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – Universidade Federal do Ceará - UFC).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Ronice Maria Pereira Franco de Sá (Núcleo de Saúde Pública e Desenvolvimento Social da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro
(Deptº de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: _____

A Natureza ama
Esconder-se

Heráclito
(540 - 470 a.C.)

Dedicatória

Dedico este trabalho às deusas que me acompanharam durante estes quatro últimos anos, em especial a Perséfone, pela inspiração de buscar a visão e a compreensão mais profundas dos mistérios ocultos de realidades maiores.

Minha Gratidão

Abel Menezes Filho - meu companheiro nos últimos 37 anos de vida, aos meus filhos **Pedro/Ilka** e **Juana**, minha obra mais bela, e à pequena **Júlia**, minha neta - a estrela mais brilhante que me ilumina hoje.

Aos meus pais **Adélia & Carlos** - por me botarem no mundo apontando o caminho.

Meus irmãos biológicos **Everaldo, Evaldo, Evanilda e Éverson** - pelo incentivo e credibilidade em mim depositados. E a todos outros irmãos que, passando pelo meu caminho, me ensinaram alguma lição. Espero não decepcioná-los.

Aos Professores:

Dr. **Haroudo Satiro Xavier** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE) - Meu orientador, pela paciência e pela convivência com o seu profundo conhecimento.

Dra. **Karina Perrelli Randau** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/ UFPE) Co-orientadora - ajuda imprescindível na conclusão deste trabalho.

Dr. **José Maria Barbosa Filho** (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB) & **Raimundo Braz Filho** (Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro) pela gentil colaboração na identificação da molécula.

Dra. **Célia Maria Machado Barbosa de Castro** (Laboratório de Imunologia Keizo Asami - LIKA/UFPE)

Dr. **Davi Pereira de Santana** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dr. **Edvaldo Rodrigues de Almeida** (Dpt^o. de Antibióticos/UFPE)

Dra. **Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dra. **Eulália Camelo Pessoa de A. Ximenes** (Dpt^o. de Antibióticos/UFPE)

Dra. **Ivone Antonia de Souza** (Dpt^o. de Antibióticos/UFPE)

Dra. **Jane Sheila Higino** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dr. **José Ângelo Rizzo** (Dpt^o. de Medicina Clínica/UFPE)

Dr. **Jose Gildo de Lima** (Dpt^o.de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dra. **Laise de Holanda Cavalcanti Andrade** (Dpt^o. de Botânica/UFPE)

Dra. **Maria Bernadete de Sousa Maia** (Dpt^o. de Fisiologia e Farmacologia/UFPE)

Dra. **Maria do Carmo de Caldas Dias Costa** (UNICAP)

Dr. **Pedro José Rolim Neto** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dra. **Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel** (Dpt^o. de Biologia UFRPE)

Dra. **Rita de Cássia Araújo Pereira** (Herbário Dárdano de Andrade Lima/IPA)

Dr. **Samuel Daniel de Souza Filho** (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

Dra. **Silene Carneiro do Nascimento** (Dpt^o. de Antibióticos/UFPE)

Dra. **Geniza de Castro Coutinho Bulhões** *in memoria* (Dpt^o. de Ciências Farmacêuticas/UFPE)

A **todos** os colegas da Pós-Graduação que passaram no Departamento durante estes anos, em especial: **Ádley Antonini, Danilo Bedor, Jackson Luiz, Lamartine Soares, Mônica Felts & Teógenes Matias de Souza** (aluno de IC).

A **Natália Gomes de Moraes** - Estagiária de Iniciação Científica do Laboratório de Imunologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, sem nenhuma dúvida uma futura pesquisadora sendo formada.

Agradecimento especial às técnicas **Rejane de Sousa Silva** (Dptº. de Fisiologia e Farmacologia/UFPE) e **Elaine de Barros Carvalho** (Responsável pelo Biotério do Dptº. de Biofísica/UFPE).

Secretárias: **Conceição Barros, Iguacy Duque & Fátima Gomes** - com meu pedido de desculpas pela amolação.

Aos amigos:

André Monteiro (FIOCRUZ/NESC) e **Carlos Pontes** (UFRPE), juntamente com **Abel Menezes** e **Karina Randau**, pelas intermináveis correções e incentivos na composição deste trabalho; **Clébio Pereira Ferreira** (UFRPE), **Iara Porto** (Escola Aberta Paulo Freire/Igarassu-PE), **Idilmar Salvador, José Guedes de Sena Filho** (LTF/UFPB), **Leila Bastos Leal** (Farmácia Escola Carlos Drumond de Andrade/UFPE), **Luis F. Lens Sardon & Maria Olívia Cano** (Herbário Dárdano de Andrade Lima/IPA)

Às Instituições:

Prefeitura Municipal de Olinda (Secretaria Municipal de Saúde)

Prefeitura Municipal do Recife (Unidade de Cuidados Integrals à Saúde Prof. Guilherme Abath)

Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA

Departamento de Biofísica (Biotério) - UFPE

Departamento de Fisiologia & Farmacologia - UFPE

Enfim,

A todos que, mesmo involuntariamente, me ensinaram alguma lição...

SUMÁRIO

	Resumo	xii
	Abstract	xiii
1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	18
3.	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1.	Aspectos Botânicos	21
3.2.	Ocorrência	25
3.3.	Aspectos Agronômicos	26
3.4.	Fitoquímica	28
3.5.	Etnomedicina	30
3.6.	Farmacologia e Toxicologia Pré-clínicas	31
4.	ESTUDO FARMACOGNÓSTICO	35
4.1.	Farmacobotânica	36
4.1.1.	Caracteres Comuns	37
4.1.2.	Caracteres Específicos	37
4.1.3.	Sinonímia Científica	38
4.1.4.	Características Macroscópicas	38
4.1.5.	Características Microscópica	40
4.1.5.1.	Secções Transversais	40
4.1.5.2.	Vista superficial da epiderme foliar	42
4.1.5.3.	Anatomia do Pó da Droga	43
4.1.5.4.	Tricomas e Estômatos em <i>Acanthospermum hispidum</i> e <i>A. australe</i>	49
4.1.5.5.	Análise Histoquímica	53
4.1.6.	Discussão	53
4.2.	Farmacocímica	56
4.2.1.	Padronização da Matéria-prima de <i>Acanthospermum hispidum</i>	56
4.2.1.1.	Testes de Pureza	56
4.2.1.2.	Determinação da Perda por Dessecação	56
4.2.1.3.	Teor de Cinzas Totais	56
4.2.1.4.	Cinzas Insolúveis em Ácido	56
4.2.2.	Perfil Fitoquímico dos Extratos de Raiz, Caule e Folha	56
4.2.2.1.	Caracterização de Derivados Cinâmicos	57
4.2.3.	Extração, Isolamento & Identificação	59
4.3.	Estudo Farmacoergástico	61
4.3.1.	Sazonalidade	61
4.3.2.	Variação Geográfica	61
4.3.3.	Desenvolvimento do Cultivo	62
5.	ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	63
5.1.	Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Bruto Metanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i> pelo Método DPPH –Método. do Radical Livre DPPH• (1,1,-difeníl-2-picrilhidrazil)	64
5.2.	Avaliação de Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Metanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i>	64
5.3.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do Extrato Bruto Metanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i>	65
5.4.	Avaliação da Atividade Citotóxica do Extrato Bruto Metanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i>	66
5.5.	Avaliação de Atividade Antiinflamatória Pulmonar do Extrato Bruto Metanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i>	66

5.5.1.	Contagem total de Células do Lavado Bronco Alveolar	67
5.5.2.	Contagem Diferencial de Células do Lavado Bronco Alveolar	68
6.	FARMACOTÉCNICA	71
6.1.	Estudo Comparativo entre Produtos do Mercado	73
6.1.1.	Propriedades Organolépticas	73
6.1.2.	Testes Físico-químicos	74
6.2.	Controle de Qualidade dos Xaropes.....	75
6.2.1.	Análise por Cromatografia em Camada Delgada	75
6.2.2.	Doseamento de Esteróides Totais	76
6.3.	Desenvolvimento da Forma Farmacêutica Xarope	77
6.4.	Estabilidade	78
6.5.	Proposta de Rótulo	79
6.6.	Proposta de Bula	80
7.	SEÇÃO EXPERIMENTAL	82
7.1.	Metodologias de Farmacognosia	83
7.1.1.	Farmacobotânica	83
7.1.1.1.	Anatomia & Histologia	83
7.1.1.2.	Histoquímica	84
7.1.1.3.	Análise do Pó da Droga	84
7.1.2.	Farmacquímica	85
7.1.2.1.	Testes de Pureza	85
7.1.2.2.	Prospecção	86
7.1.2.3.	Extração, Isolamento e Identificação de Constituintes	88
7.1.3.	Farmacorgásia	89
7.1.3.1.	Sazonalidade	89
7.1.3.2.	Variação Geográfica	89
7.1.3.3.	Desenvolvimento do Cultivo	89
7.2.	Metodologias das Atividades Biológicas	90
7.2.1.	Avaliação de Atividade Antioxidante	90
7.2.2.	Avaliação de Atividade Antimicrobiana	91
7.2.3.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória	93
7.2.4.	Avaliação de Atividade Citotóxica	94
7.2.5.	Avaliação de Atividade Antiinflamatória Pulmonar	96
7.2.5.1.	Animais	96
7.2.5.2.	Administração do LPS	97
7.2.5.3.	Lavado Broncoalveolar (LBA)	97
7.2.5.4.	Contagem Total de Células do LBA	98
7.2.5.5.	Contagem Diferencial de Células do LBA	99
7.3.	Metodologia Farmacotécnica	100
7.3.1.	Estudo comparativo entre produtos do mercado	100
7.3.1.1.	Propriedades Organolépticas	100
7.3.1.2.	Testes Físico-químicos	100
7.3.1.3.	Controle de Qualidade	101
7.3.2.	Forma Farmacêutica do Xarope	102
7.3.3.	Doseamento de Esteróides Totais	102
7.3.3.1.	Preparo das Amostras	103
8.	CONCLUSÕES	104
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
10.	ANEXOS	121

LISTA DOS QUADROS

3.1.	Nomes Populares de <i>Acanthospermum hispidum</i>	21
3.2.	Sinonímia científica de <i>Acanthospermum hispidum</i>	23
3.3.	Metabólitos secundários relatados em <i>Acanthospermum hispidum</i>	29
3.4.	Indicações etnomédicas sobre <i>Acanthospermum hispidum</i>	31
3.5.	Atividades biológicas relatadas em <i>Acanthospermum hispidum</i>	32
3.6.	Toxicologia pré-clínica de <i>Acanthospermum hispidum</i>	33
4.1	Principais caracteres diferenciais entre as espécies <i>Acanthospermum hispidum</i> e <i>Acanthospermum asutrale</i>	51
4.2.	Resultado dos testes histoquímicos em <i>Acanthospermum hispidum</i>	53
4.3.	Metabólitos identificados nas duas espécies de <i>Acanthospermum</i>	57
6.1.	Propriedades organolépticas dos produtos de <i>Acanthospermum hispidum</i> comercializados na Região Metropolitana do Recife	74
7.1.	Metabólitos, fases móveis e reagentes de caracterização	87

LISTA DAS TABELAS

4.1.	Resultado experimental de RMN e ¹³ C	59
6.1.	Propriedades físico-químicas de produtos comerciais de <i>A. hispidum</i> .	74
6.2.	Resultados das leituras de doseamento de esteróides	77
6.3.	Dosagens de esteróides totais	77

LISTA DAS FIGURAS

3.1.	<i>Acanthospermum hispidum</i> , indivíduo adulto.....	24
3.2.	Distribuição geográfica de <i>Acanthospermum hispidum</i>	26
4.1.	Aspectos dos dois gêneros	40
4.2.	Vista transversal da raiz	41
4.3.	Vista transversal do caule de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC	41
4.4.	Folha de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC (Asteraceae)	42
4.5.	Vista frontal da epiderme da folha de <i>Acanthospermum hispidum</i>	43
4.6	Células dissociadas da raiz de <i>Acanthospermum hispidum</i>	44
4.7.	Células dissociadas da raiz de <i>Acanthospermum australe</i>	45
4.8.	Células dissociadas do caule de <i>Acanthospermum hispidum</i>	46
4.9.	Células dissociadas do caule de <i>Acanthospermum australe</i>	47
4.10.	Células dissociadas da folha de <i>Acanthospermum hispidum</i>	48
4.11.	Células dissociadas da folha de <i>Acanthospermum australe</i>	49
4.12.	Tricomas em espécies de <i>A. hispidum</i> e <i>A. australe</i>	50
4.13.	Cromatograma de extratos hidrolisados	58
4.14.	Estrutura das moléculas de estigmasterol e β -Sitosterol	60
4.15.	Fases de crescimento de <i>Acanthospermum hispidum</i>	61
4.16	Canteiros com plantas transplantadas após 25 dias de germinadas	62
5.1.	Atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>A. hispidum</i>	65
5.2.	Gráfico representativo da contagem total de células inflamatórias	67
5.3.	Gráfico representativo da contagem diferencial de neutrófilos	68
5.4.	Gráfico representativo da contagem diferencial de eosinófilos	69
6.1.	Produtos contendo <i>A. hispidum</i> comercializados	73
6.2.	Coloração e transparência dos produtos de <i>Acanthospermum hispidum</i> comercializados na Região Metropolitana do Recife	73
6.3.	Cromatograma das amostras de xaropes comerciais	75
7.1.	Preparação cirúrgica para realização do lavado broncoalveolar	98

LISTA DE SIGLAS & SÍMBOLOS

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CI₅₀ = Concentração Inibitória em 50% da amostra

CMI = Concentração Mínima Inibitória

cP = centi Poise

DL₅₀ = Dose Letal para 50% da amostra

DMSO = Dimetil sulfóxido

DO = Densidade Óptica

DPPH = 1,1,-difeníl-2-picrilhidazil

EBM = Extrato Bruto Metanólico

FNT = Fator de Necrose Tumoral

LBA - Lavado Bronco Alveolar

LPS = Lipopolissacáride

MeOH = Metanol

MTT = 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

OMS = Organização Mundial de Saúde

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

WHO = World Health Organization

∅ = Tintura

RESUMO

Acanthospermum hispidum tem suas raízes empregadas no tratamento da asma, fazendo parte da formulação de um xarope, prescrito como antiasmático, nos postos de saúde da Prefeitura de Olinda, desde o final da década de 80. O rápido sucesso do produto apontou para a necessidade de aprofundamento dos conhecimentos sobre esta espécie vegetal. Atualmente, além dos diversos programas para uso de plantas medicinais, em muitos municípios, é possível encontrar no comércio especializado em produtos naturais, algumas formulações manipuladas com esta espécie que, no entanto, não atendem às exigências mínimas da legislação, no que diz respeito ao controle de qualidade, comprovação da eficácia e segurança. Este trabalho, através de metodologias usuais, realizou uma abordagem Farmacognóstica, da Atividade Biológica, além de uma Avaliação Farmacotécnica do xarope. Os resultados obtidos permitem a caracterização farmacobotânica, por meio da diferenciação entre *A. hispidum* e *A. australe*, ambas de ocorrência na região; a determinação do perfil fitoquímico; o isolamento e identificação de dois esteróides passíveis de serem usados como marcadores fitoquímicos; a comprovação da atividade antiinflamatória pulmonar, permitindo, além disso, um avanço na determinação de um método de doseamento para o controle de qualidade de fitoterápicos, a partir da matéria-prima.

Palavras-chave: *Acanthospermum*, Espinho-de-cigano, plantas medicinais, fitoquímica, esteróides, antiasmático.

ABSTRACT

The root of *Acanthospermum hispidum* are used to treat asthma, been part of the syrup recommended as anti-asthmatic in health centers of the City Hall of Olinda since the end of 80's. The rapid success of this product showed to the necessity of a development of the knowledge about this specie. Nowadays, besides several projects for use of medicinal plants in many cities, it is possible to find in the commerce specialized in natural products, some formulations manipulated with this specie, which, however, do not pay attention to the least demands of the legislation, what concerns the quality control and proof of the efficiency and security. This study used common methodologies to evaluate the Pharmacognosy, the Biological Activity and the Pharmacotechnique Development. The results permit to characterize the pharmacobotany, through the identification of differences between *A. hispidum* and *A. australe*, both occurring in the same region. It is also possible to determine the phytochemical profile, to isolate and to identify the substances capable to be used like phytochemical markers, useful to evaluate the pulmonary anti-inflammatory activity. It allowed advancement in the determination of a method to attribute doses for the quality control of a phytoterapic product from the raw material.

Kay word: *Acanthospermum*, medicinal plants, steroids, phytochemistry, anti-asthmatic.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Buscando o diálogo e a integração com o saber popular, bem como identificar os recursos utilizados pela população na resolução de seus problemas de saúde, em 1983, a Secretaria de Saúde da Prefeitura da cidade de Olinda iniciou seu programa de “medicina caseira”, tentando ainda selecionar um elenco de plantas e seus modos de preparo, para um uso mais seguro.

O que a princípio seria apenas um registro etnológico, logo se transformou no primeiro programa de utilização de plantas medicinais em serviço público, no Brasil.

No Estado de Pernambuco, o Espinho-de-cigano, como é conhecido popularmente o *Acanthospermum hispidum*, tem o emprego de suas raízes, entre outras indicações, para o tratamento da asma, passando a ser usadas na forma de xarope, prescrito como antiasmático nos postos de saúde da Prefeitura de Olinda, desde o final da década de 80. O sucesso do produto, em pouco tempo, apontou para a necessidade de se aprofundar os conhecimentos sobre aquele vegetal.

Conforme constatado por Araújo *et al.* (2002), atualmente, fora do âmbito dos diversos programas para uso de plantas medicinais de muitos municípios, é possível encontrar, também, no comércio especializado em produtos naturais, algumas formulações manipuladas com esta espécie vegetal que, no entanto, não atendem às exigências mínimas da legislação, no que diz respeito ao controle de qualidade, à comprovação da eficácia e da segurança (ANVISA, 2004), se reconhecendo que, muitas vezes, não tem sido possível atender às tais exigências, nos casos de produtos adaptados do bulário popular. Apesar do uso consagrado estes, não raro, continuam sem a comprovação da

eficácia ou da segurança, submetendo seus usuários a riscos imprevisíveis.

Só em 1988, através de convênio firmado com a UFPE e financiamento do Finsocial do BNDES, foram possíveis os primeiros estudos envolvendo a espécie, proporcionando mais segurança, e adequação da sua fórmula, inicialmente popular, para a atual apresentação farmacêutica encontrada.

A importância de se buscar outras opções terapêuticas para o tratamento da asma deve-se ao fato de que mesmo que nos últimos anos, se constate um grande avanço no seu tratamento em relação ao desenvolvimento de novas drogas, este aumento de conhecimento, não causou um impacto proporcional na morbidade da doença, mostrando inclusive uma tendência a aumentar a prevalência, mesmo nos países mais desenvolvidos, que a torna uma das doenças mais incidentes na infância. Sua prevalência mundial (número de crianças acometidas) varia de 1,6% na Indonésia a 36%, no Reino Unido, estando o Brasil situado na faixa dos 13%, com 20% no Recife (RIZZO & PITANGA, 2004). Este quadro representou para o Brasil, no ano de 2004, duzentos mil internamentos na faixa etária abaixo dos 14 anos, com 3 mil mortes (STEIN, 2006) e com uma incidência de readmissão hospitalar em 65% dos casos (LASMAR, 2006). Sua importância resulta, também, de ser esta, uma doença que compromete muito a qualidade de vida, limitando a capacidade corporal e sendo causa significativa de absenteísmo no trabalho ou na escola. Entre os adultos representa, também, um importante problema, pois frequentemente seu controle é difícil, podendo estar associado a outras baixas condições de saúde, tornando a situação clínica global do paciente mais grave (GOODMAN & GILMAN'S, 2006).

Assim, este trabalho buscou, antes de tudo pesquisar, de maneira objetiva, uma planta consagrada popularmente, apresentando

informações que possam contribuir para o seu uso mais criterioso, do ponto de vista do método científico.

A disposição dos capítulos seguiu a seqüência de abordagem para Caracterização/Identificação (Farmacognosia), Estudo de Atividade Biológica e Farmacotécnica, estando todas as metodologias numa única secção (Capítulo 7) o que oferece um fluxo de leitura mais dinâmico, no que diz respeito a resultados, principalmente tendo em vista a interdisciplinaridade do trabalho. A elaboração do roteiro e redação desta tese foi baseada num artigo de Pontes *et al* (2005), sobre a confecção de trabalhos acadêmicos.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae), fornecendo resultados para uma padronização farmacognóstica, com avaliação da atividade biológica e a avaliação farmacotécnica de um xarope.

2.2. Específicos

2.2.1. Estudar *Acanthospermum hispidum* no enfoque farmacognóstico (farmacobotânico, farmacológico e farmacoterapêutico);

2.2.2. Analisar comparativamente os caracteres anatômicos e histoquímicos das duas espécies de *Acanthospermum* que ocorrem no Estado de Pernambuco;

2.2.3. Isolar e elucidar possíveis marcadores químicos deste vegetal;

2.2.4. Determinar a atividade biológica na árvore brônquica;

2.2.5. Realizar estudo comparativo entre os produtos existentes no comércio com *A. hispidum*;

2.2.6. Otimizar forma farmacêutica já existente do xarope.

CAPÍTULO III

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ASPECTOS BOTÂNICOS

O conhecimento da sinonímia popular da espécie, em uma abordagem antropológica, deve ser a primeira etapa da investigação de uma planta, independente do tema de estudo. Isto se justifica pelo fato de que, na maioria dos casos, estas plantas, conforme a região, apresentarem uma imensa variedade de nomes devidos a ação observada ou algum detalhe morfológico ou anatômico observados. Neste sentido, a atualização bibliográfica, acerca de *Acanthospermum hispidum* mostrou a existência de inúmeras citações, as quais estão apresentadas no Quadro 3.1, juntamente com as referências bibliográficas e, quando possível, a região ou país de origem.

Quadro 3.1. Nomes Populares de *Acanthospermum hispidum*.

Nomes	Referências
No Brasil Amor-de-negro (MG), Benzinho (MG), Cabeça-de-boi (CE), Camboeiro (CE), Carrapicho-de-carneiro, Carrapicho-rasteiro (BA), Chifre-de-carneiro (PR), Chifre-de-veado (PR), Comboeiro (PE), Espinho-de-agulha, Espinho-bravo, Espinho-de-carneiro, Espinho-de-cigano (PE), Federação ou Federal (PE), Maroto (MG), Mata-pasto, Picão-da-praia, Poejo-da-praia, Retirante (CE).	ARANHA, 1972; BRAGA, 1976; BRANDÃO, 1986-1; COIMBRA, 1994; CORRÊA, 1978; COSTA, 1941; LORENZI, 1982; MATOS, 1997.
Em língua inglesa: Bristly-Starbur, Goat's-head, Star-burr Slingshot, Texas-cockspur, Upright-starbur,	Natural Resources Conservation Service, 2005;
Outros Idiomas Cacharro; Carrapichno; Carrapicho rasteiro (CO); Chinna-Palleru; Corona-de-la-reina (ES); Cuagrilla; Cujarilla (AR); Dágunró (Para-guerra em jêje-nagô); Espinoso (BO); Espuela-de-Caballero; Estrella (BO); Gandhichedi; Gokhura; Guagrilla (AR); Gurkul-Kanta; Herbe-tricorne (Mauritius); Hurab-Elhowsa; Jiina-ia-kawaida (leste da África); Kaandhi-thala (Malásia); Kasinyawo (Nigeria); Kattu-neinji (India); Malamujer (Rep Dom); Ovesha Ca-a; Pecado-Mortal; Saroto (India); Sraha-Nsoe; Tacuc (BO); Toro-rati (Paraguai); Torito (AR); Yerba-del-Pecado-Mortal.	CORRÊA, 1978; HORTIPLEX DATABASE, 2005; Natural Resources Conservation Service, 2005; MS SWAMINATHAM RESEARCH FOUNDATION, 2005.

Os nomes que compõem o binômio *Acanthospermum hispidum* derivam das palavras gregas, *ákanthos* e *sperma*, respectivamente, espinho e semente (CUNHA, 1982). O epíteto *hispidum* tem origem latina, identificando o áspero, de pêlo hirsuto (SARAIVA, 2000). No conjunto, a classificação definiria uma espécie hirsuta, com sementes guardadas de espinhos.

Asteraceae (Dumortier 1822 nom. conserv.), em compêndios antigos ainda é referida como Compositae, constituindo a maior família das angiospermas (CRONQUIST, 1981; BARROSO *et al.* 1996), com mais de 1.500 gêneros e cerca de 25.000 espécies reconhecidas (ICBN, 2005), o que representa 10% da flora mundial (BREMER, 2001), já denotando seu enorme poder de adaptação. No Brasil, está representada por cerca de 180 gêneros (BARROSO, 1991). Apesar de 98% de suas espécies serem constituídas de plantas de pequeno porte, inclui também subarbustos, trepadeiras e, excepcionalmente, árvores. Sua principal característica são as flores reunidas em capítulos (JOLY, 1987; BARROSO, 1991).

Acanthospermum (Schrank. Pl. Rar. Hort. Monac. 53, 1819) (ARANHA *et al.* 1972), está constituído por plantas anuais, herbáceas, eretas ou prostradas. As folhas são simples, opostas, com bordas inteiras ou serradas e inflorescência axilar ou terminal, de flores amareladas. O fruto é um aquênio, oblongo, com cerdas persistentes e rijas.

Apesar da sinonímia científica extensa (cf. Quadro 3.2), o binômio válido da espécie em estudo é: *Acanthospermum hispidum* DC Prodr. 5: 522, 1836 (Asteraceae).

Quadro 3.2. Sinonímia científica de *Acanthospermum hispidum*

Classificação	Referência
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC,	ARANHA, 1972; IPA, 1997.
<i>Acanthospermum acanthioides</i> DC	COIMBRA, 1942.
<i>Acanthospermum brasiliium</i>	CORRÊA, 1978; CRUZ, 1964
<i>Acanthospermum humile</i> var. <i>hispidum</i> (DC) Kuntze, 1891	VIA RURAL, 2007
<i>Acanthospermum humile</i> Eggers	CORRÊA, 1978; LORENZI, 1982
<i>A. humile</i> (Sw.) DC.	VIA RURAL, 2007
<i>Acanthospermum xanthioides</i>	CORRÊA, 1978; LE COINT, 1947
<i>Melampodium humile</i> Sw	VIA RURAL, 2007

Acanthospermum hispidum é uma planta anual, ereta, com caule e folhas densamente pubescentes, atingindo até 1m de altura. Tem sistema radicular ramificado, apresentando uma raiz principal com até 20 cm de comprimento. Este conjunto desprende aroma suave, característico, levemente adocicado. O caule está ornado com pêlos delgados, com folhas de sabor amargo, simples e opostas, medindo em média 6 x 3 cm. As inflorescências são axilares, em capítulos, com pequenas flores amarelas. Os frutos são do tipo aquênio, de forma triangular, compridos, recobertos por cerdas irregulares, lhe conferindo vários outros nomes populares, entre os quais, carrapicho-de-carneiro ou carrapicho-de-três-pontas (ARANHA *et al.* 1972; CORRÊA, 1978; LORENZI, 1982; COIMBRA, 1994) (cf Fig. 3.1).

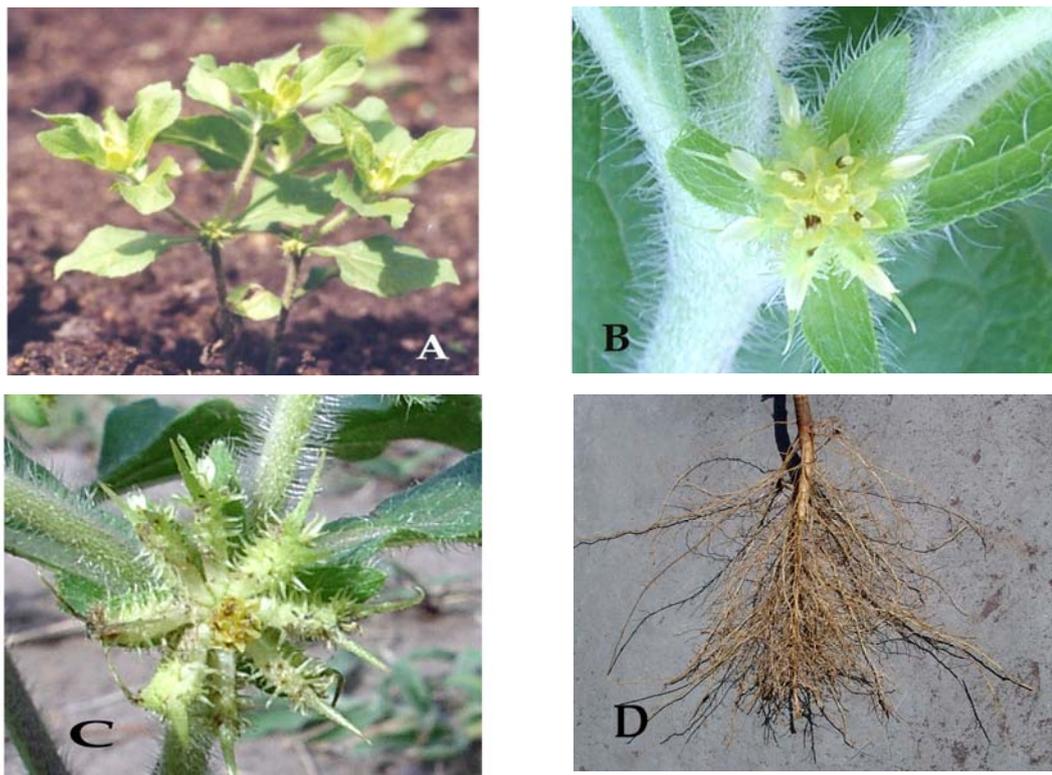


Figura 3.1. *Acanthospermum hispidum*, indivíduo adulto: (a) planta com dois meses de cultivada; (b) inflorescência; (c) frutos e (d) raiz.

Stuessy (*in* SEAMAN, 1980) realizou duas revisões da subtribo *Melampodiinae*, em 1973 e 1977; no segundo estudo redistribuiu os gêneros. Em 1979, Bohlmann propôs a utilização de sesquiterpenolactonas para a identificação da tribo *Heliantheae*, como um marcador quimiotaxonômico. As lactonas sesquiterpênicas têm, assim, uma indiscutível importância taxionômica para *Asteraceae*, onde cerca de novecentos destes compostos já foram identificados, alguns apresentando atividades antiparasitária, antibiótica e anticancerígena (BRUNETON, 1991; EVANS, 1996).

Outra espécie de *Acanthospermum*, de uso bastante difundido e ocorrência mais comum no Brasil, *A. australe* é conhecida por vários nomes populares comuns para *A. hispidum* (carrapichinho, carrapicho-de-carneiro, carrapicho-rasteiro, etc.), o que pode levar ao uso indevido pela população. As duas principais espécies (*A. australe* e *A. hispidum*)

são infestantes de lavouras, e, em diversas regiões, têm as mesmas indicações medicinais (LORENZI, 1982; LORENZI & MATOS, 2002).

3.2. OCORRÊNCIA

No início da colonização do Brasil não foram raras as espécies trazidas por europeus e africanos, aqui aclimatadas e incorporadas ao já rico acervo do nosso patrimônio vegetal. Da mesma forma, outras espécies foram levadas para fora, muitas vezes de forma involuntária, a exemplo do próprio *Acanthospermum*, cujas sementes são aderentes a roupas ou pêlos de animais, estando hoje dispersa em diversos países de outros continentes. Este fato foi relatado em 1941, por Costa, citando Freire Alemão sobre a introdução de *Acanthospermum* no Ceará, em 1845, recebendo o nome de "retirante", provavelmente por ter acompanhado a migração das populações, que fugiam da seca.

Apesar de pantropical (MENUT *et al.* 1995), a espécie tem sua origem atribuída à América Central e Meridional (BRAGA, 1976), ocorrendo no Brasil, desde o Piauí ao Rio Grande do Sul (BRAGA, 1976; CORRÊA, 1978). Provavelmente, a partir da América do Sul foi introduzida na Índia (NAIR *et al.* 1985) e África (SUMMERFIELD & SAALMULLERA, 1998). Em decorrência de seu caráter invasor de culturas tem sido relatada em muitos trabalhos, pelo Brasil afora, desde as lavouras de trigo no Estado de Minas Gerais (mesmo que ali *A. australe* seja a espécie predominante) (CUNHA *et al.* 1985; BRANDÃO *et al.* 1986-1), até as áreas urbanas litorâneas do município do Rio de Janeiro (BRANDÃO *et al.* 1986-2), com menor presença no Norte e Noroeste (cf. Figura 3.2).



Figura 3.2. Distribuição geográfica de *Acanthospermum hispidum*. (adaptado de LORENZI, 1982).

Em Pernambuco, ocorre predominantemente no litoral, tendo sido detectada, também, no Agreste e Sertão, incluindo Caruaru, Belo Jardim, Buique, Sertânea, Ouricuri, Betânia, Parnamirim e Petrolina (TABARELLI & SILVA, 2002).

3.3. ASPECTOS AGRONÔMICOS

Embora *A. hispidum* seja focalizada, principalmente, como uma espécie invasora de culturas, nos últimos anos, a partir do sucesso do xarope produzido com este vegetal nos serviços públicos de várias prefeituras, surgiu a necessidade de oferta de matéria-prima durante todo o ano, o que levou ao seu cultivo, uma vez que sua ocorrência espontânea se restringe ao período das chuvas.

Empregando cromatografia em camada delgada, Xavier & Araújo (1998) estudaram amostras da planta cultivada e de ocorrência espontânea, constatando não haver diferença qualitativa de padrão fitoquímico. A sua utilização por bovinos, quando da escassez de pasto, despertou, também, um interesse maior pelo seu estudo, devido à

existência de toxicidade nas sementes (CUNHA *et al.* 1985), tanto em *A. hispidum* quanto em *A. australe* (OLIVEIRA *et al.* 2005).

Apesar de ser pouco competitiva, em relação às outras espécies invasoras (VOLL *et al.* 1997), tem se mostrado resistente a vários tipos de herbicidas, como referem Reddy (1965) e Luo & Matsuomoto (2002), apresentando, inclusive, atividade inseticida contra larvas de uma espécie de joaninha (*Epilachna varivestis*) (KRAUS *et al.* 1994).

De modo geral, as sementes de *A. hispidum* são incorporadas ao solo, onde podem permanecer por períodos de até oito anos, germinando a cada manejo (SCHWERZEL & THOMAS, 1976), na dependência de chuvas e de aumento da temperatura. Além disso, Garcia (1992) constatou uma dormência das sementes, provavelmente relacionada com fatores climáticos, cujo tratamento mais eficiente foi a incubação no escuro, por períodos de 10 - 30 dias.

Os ensaios preliminares realizados por Messias & Noronha (1994), no IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), sugerem como adequada, uma adubação com 15% de composto urbano, acrescido de amônia, fosfato e potássio (40-20-40).

De ocorrência espontânea, tanto em terrenos arenosos como argilosos, durante seu desenvolvimento em cultivo, a evolução da fase de floração para a de frutificação é muito rápida, demonstrando a prioridade do vegetal em direcionar seu metabolismo para a reprodução, como forma de preservação da espécie, quando comparado à produção de defesas químicas (MIRANDA, 1996).

3.4. FITOQUÍMICA

O estudo mais antigo sobre fitoquímica é de Costa (1941), onde relata a presença de alcalóide a que chamou de acantospermina. Mais tarde, Herz (1975), pesquisando sesquiterpeno-lactonas com potencial atividade biológica e Ramachandran *et al.* (1976), ao mesmo tempo em que Mathur & Bejarane (1976) apresentam seus estudos com *A. hispidum*. Estas substâncias têm distribuição limitada, ocorrendo predominantemente nas Asteraceae (SEAMAN, 1980).

As sesquiterpeno-lactonas são quimicamente distintas de outros sesquiterpenóides, devido à presença de um sistema α -metileno- γ -lactona, muitas contendo carbonilas α,β -insaturadas e epóxidos, constituindo um grupo de compostos com amplo espectro de atividade biológica, como antimicrobiano e antitumoral (ROBERS, 1997). As lactonas sesquiterpênicas estão igualmente presentes em *A. australe* e em representantes dos gêneros *Melampodium* e *Smallanthus* (BOHLMAN *et al.* 1981). As lactonas sesquiterpênicas têm assim uma indiscutível importância taxonômica para as Asteraceae, onde milhares destes compostos já foram identificados, sobretudo, em tricomas glandulares de folhas e flores (HARBORNE, 1998), alguns apresentando atividades antiparasitária, antibiótica e anticancerígena (SEAMAN, 1980; BRÜNETON, 1991; EVANS, 1996).

Por sua promissora composição química Asteraceae certamente tem atraído mais exaustivamente os estudiosos, já tendo proporcionado o desenvolvimento de fármacos e inseticidas, a exemplo do piretro, entre outros (ZOMLEFER, 2005). No caso específico de *A. hispidum*, é bastante vasta a literatura em relação à pesquisa de componentes de relevância, tanto para utilização na quimiotaxonomia, quanto no que se refere ao potencial terapêutico.

Um condensado de pesquisas fitoquímicas com *A. hispidum* é apresentado no Quadro 3.3.

Quadro 3.3. Metabólitos secundários relatados em *Acanthospermum hispidum*.

Parte da Planta/Metabólitos secundários	Referências
<p>Planta inteira <i>n</i>-butyl eicosanate, eicosanoato, heptacosan-1-ol triacontane; <i>n</i> alcanos em C5 ou mais</p>	<p>MATHUR & BEJARANE, 1976, NAIR, 1976</p>
<p>Parte Aérea da Planta Predominantemente lactonas sesquiterpênicas e alguns glicosídeos destes (acanthospermol-β-galactosidopiranosídeo), além de carboidratos comuns como glicose, frutose, manose e sacarose. Guaianólidos hispidimolidos A e B (C₂₂H₂₈O₈), melampólido, lolióido e alcalóides.</p>	<p>BOHLMANN, 1979; CARTAGENA, 2000; JAKUPOVIC, 1986; GERAN, 1986; HERZ, 1975; HUSSAIN, 1990; RAMACHANDRANA, 1976; SANON, 2003-2.</p>
<p>Folhas Saponinas, glicosídeos de sesquiterpenos (β-cariofileno, α-humuleno, biciclogermacreno, germacreno D, α-bisabolol) polifenóis (flavonas, ácido caféico e fenilpropanóides), alcalóides, galactosídeos de acanthospermol, açúcares (fucose, rhamnose, ribose, arabinose, xilose, manose e glicose).</p>	<p>MENUT, 1995; ODEBIYI, 1978; RAMACHANDRANA, 1985; SULTANBAWA, 1978; SUMMERFIELD, 1997.</p>
<p>Raízes Saponinas, monoterpenos fenólicos, diterpenos e glicosídeos de diterpenos, aminoácidos, açúcares comuns e polifenóis (catequinas, cumarinas, flavonas, ésteres de ácido caféico).</p>	<p>ARAÚJO, 1989; CAETANO, 1990; NAIR, 1985; XAVIER, 1998; RAMACHANDRANA, 1976.</p>

3.5. ETNOMEDICINA

Entre as propriedades medicinais atribuídas a *A. hispidum* também foi constatada grande variação, tanto com relação à indicação propriamente dita, como à parte da planta a ser utilizada. Assim, verificou-se que na Colômbia as folhas são utilizadas via oral, para tratamento da dismenorréia (GARCIA-BARRIGA, 1975), enquanto em Madagascar as raízes são usadas no tratamento da disenteria (NOVY, 1997). No Brasil, a referência básica sobre plantas medicinais, desde o início do século XX, Pio Corrêa (1926), indica o uso das raízes como “peitoral”, contra tosse e bronquite. Enquanto outros binômios aparecem, no dicionário deste autor com o mesmo nome popular, com indicações para febres intermitentes, erisipela e blenorragia, chamando a atenção para as sementes, as quais diz serem tóxicas para galinhas.

Dentre as várias indicações populares para *A. hispidum*, a que mais chama a atenção é aquela referente ao tratamento de espasmos brônquicos (BRAGA, 1976; LORENZI, 1982; SILVA & OLIVEIRA, 1994; MATOS, 1997).

Ainda contemplando o uso popular, BARROS & NAPOLEÃO (2003), apontam a utilização de *A. hispidum* em trabalhos de “amarração”¹ de rituais do candomblé, de origem africana jêje-nagô.

No Quadro 3.4 encontram-se relacionadas informações pertinentes às indicações populares descritas na literatura.

¹ Os trabalhos de amarração, segundo dicionários atuais têm sempre a conotação de ligações amorosas (FERREIRA, 1999; HOUAISS, 2001).

Quadro 3.4: Indicações etnomédicas sobre *Acanthospermum hispidum*.

INDICAÇÕES	REFERÊNCIAS
Parte da Planta não Explicitada Béquica; antifebril; peitoral; usada nas bronquites alérgicas; como diaforético, depurativo e adstringente; doenças infecciosas, como antihelmíntica, abortiva e para o tratamento da hipertensão.	BRAGA, 1976; LORENZI, 1982; DEL VITTO <i>et al.</i> , 1997; MENUT <i>et al.</i> , 1995, FLEISCHER <i>et al.</i> , 2003.
Planta Inteira Contraceptivo, peitoral e antifebril, para tosses e bronquites, abortiva, tóxicas para animais.	MARTINEZ-COURVETTO, 1981; MATOS, 1997; LEMONICA & ALVARENGA, 1994; ADAM, 1978.
Parte Aérea Diurético, febrífugo, afecções de vias urinárias, blenorragias, erisipela.	COIMBRA, 1994; HUSSAIN <i>et al.</i> , 1990.
Folha Antidismenorréia, antigonorréia, antidisentérica, contra hematuria, antifebril, trabalhos de candomblé.	GARCIA-BARRIGA, 1975; CACERES <i>et al.</i> , 1995; NOVY, 1997; REDDY <i>et al.</i> , 1989; RAMACHANDRAN <i>et al.</i> ; 1981; BARROS & NAPOLEÃO, 2003.
Caule Antidisentérica,	NOVY, 1997.
Raízes Disenteria, expectorante, contra tosses e bronquites, bronquites alérgicas,	NOVY, 1997; LORENZI, 1982; SILVA & OLIVEIRA, 1994; DINIZ <i>et al.</i> , 1997.

3.6. FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA PRÉ-CLÍNICAS

No tocante à Farmacologia, apesar de extensa a lista de referências com a espécie, também são raros os estudos utilizando as raízes, conforme se pode observar no Quadro 3.5.

Quadro 3.5. Atividades biológicas relatadas para *Acanthospermum hispidum*.

Parte da Planta não Explicitada	Referências
Atividade anticâncer <i>in vivo</i>	JAKUPOVIC, 1986
↑ frequência cardíaca, ↑ fluxo coronariano, ↑ amplitude das contrações cardíaca e ↓ pressão arterial	MEDEIROS, 1988
Inibiu contração induzida pela histamina (80%) em íleo isolado de cobaia; Inib. contração induzida pela ocitocina (100%) e bradicinina (69%) em útero isolado de rata e contração em traquéia isolada de cobaia em relação à isoprenalina	BRANDÃO, 1988
Bactericida, fungicida e desestimulante do apetite (<i>antifeedant</i>). Inseticida contra <i>Epilachna varivestis</i>	KRAUS, 1994
Parte Aérea	
Adoçante	HUSSAIN, 1990
Acanthospermólide teve atividade anticâncer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; Atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i> (folhas +caules)	FLEISCHER, 2003; SANON, 2003-1
Folhas e flores apresentaram inibição significativa contra <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhi</i> e <i>Clostridium histolyticum</i> . Ativo contra os fungos: <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Cladosporides cladosporioides</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	PORTILLO, 2001
↑ Resistência provavelmente por ↑ hematopoiese esplênica	PEREIRA, 2001
Planta Inteira	
Inativa contra <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. amazonensis Trypanosoma cruzi</i>	FOURNET, 1994
Folhas	
Atividade moluscicida (<i>Bionphalaria glabrata</i>)	SILVA, 1996
Ativa contra <i>Neisseria gonorrhoea</i>	CACERES, 1995
Ativa contra <i>Vírus-Pseudorabies</i>	SUMMERFIELD, 1997
↑ discreto da produção de Ig G; ↑ discreto na produção de interleucina-2 e 4; ↑ proliferação de leucócitos; não ativa monócitos;	SUMMERFIELD, 1998
Fração polar foi ativa contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> e <i>Clostridium histolyticum</i>	FLEISCHER, 2003; MENUT, 2003
Não apresentou atividade contra as seguintes cepas: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Vírus-Herpes simplex</i> , <i>Poliovirus I</i> , <i>Sindbis</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	EL TAHIR, 1999
Raízes	
Boa atividade contra <i>Staphylococcus aureus</i> , menor contra <i>Salmonella</i> e <i>E. coli</i> .	ARAÚJO, 1989
i.v. = hipotensão independente da dose, efeito não bloqueado pela atropina ou propanolol; não inibiu edema de pata por carragenina; Em modelo de perfusão pulmonar ↓ fluxo pulmonar em cobaia.	CAETANO, 1990

Em relação à toxicidade, estudos preliminares realizados através do convênio UFPE/Prefeitura de Olinda, em 1989, sugerem que *A. hispidum* é uma erva segura, pelo menos para uso em curto prazo

(ARAÚJO *et al.* 1989), fato confirmado em outras publicações posteriores, onde a espécie não apresentou efeito mutagênico nem bactericida, ou efeito letal, na dose de 1 - 2g/kg de peso (HUSSAIN *et al.* 1990). Entretanto, estudos de Bakhita & Adam (1978), já haviam demonstrado toxicidade das sementes usadas na dieta, com óbitos em camundongos, devidos à necrose de fígado, atrofia glomerular, congestão e hemorragia de baço, de pulmão e coração, além de enterite catarral (BAKHITA & ADAM, 1978-1 e 1978-2). Esta toxicidade das sementes ainda torna sua classificação como de uso restrito pelo FDA² (2005) (cf. Quadro 3.6).

Quadro 3.6. Toxicologia pré-clínica de *Acanthospermum hispidum*.

Distúrbios	Referência
Parte da planta não especificada	
Atividade citotóxica; 1-2 g/kg de peso não apresentou toxicidade aguda, nem efeito mutagênico	JAKUPOVIC,1986; HUSSAIN, 1990
Partes aéreas	
Não causou aborto no período organogênico, porém deve bloquear a implantação.	LEMONICA,1994
Não apresentou atividade ictiotóxica em nenhuma concentração usada.	DUTRA, 1996.
Sementes	
Hemorragias, fraqueza e diarreia. Mau formações externas, aborto e anomalias viscerais	DI STASI,1989
Brotos e Sementes	
Usados na dieta (% = 50, 30, 10 e 5), foram tóxicos. ↓ apetite, ↑ respiração, ascite, alterações no pêlo, alterações viscerais hemorrágicas, depressão e dispnéia, morte. Efeito cumulativo, mesmo em baixas doses.	BAKHITA, 1978 1 e 2
Planta Inteira	
Citotóxica	BHAKUNI, 1971
Raiz	
DL ₅₀ i.p. = dose de até 2g/kg de peso não ocasionou nenhum óbito	ARAÚJO,1989

² Federal Drugs Administration /USA

Pelo levantamento da literatura, na maioria das pesquisas publicadas com essa planta, desde o banco de dados NAPRALERT³ (com referências bibliográficas contidas, de 1971 a 2003), até as mais atuais, em sua maioria, se refere a dados etnomédicos, de atividade biológica e fitoquímica, com a parte aérea da planta, não havendo uma proporcionalidade de publicações sobre o uso, freqüente, que se faz em nossa região, da raiz.

Excetuando-se dois trabalhos de Ramanchadran *et al.* (1976 e 1985), os outros dois estudos encontrados focalizando a raiz de *Acanthospermum hispidum*, seja fitoquímico, ou de ensaio biológico, foram realizados na UFPE por Araújo *et al.*, 1989 e Caetano *et al.*, 1990, o que demonstra o pouco interesse dos pesquisadores em relação àquela parte do vegetal, em outros centros de estudo.

³ Natural Products Alert – Banco de Dados da Universidade de Illinois/EUA

CAPÍTULO IV

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO

4. ESTUDO FARMACOGNÓSTICO

Este capítulo analisa os caracteres anatômicos, histoquímicos e fitoquímicos, além da identificação e controle de qualidade da droga de *Acanthospermum hispidum*, compreendendo a sua descrição e estudo de possíveis adulterações, além de um estudo comparativo com *A. australe*, frequentemente utilizada em substituição à primeira.

4.1. FARMACOBOTÂNICA

Acanthospermum hispidum DC. e *Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze (Asteraceae) são, ambas, conhecidas como “espinho-de-cigano”, “carrapicho-de-carneiro” e “carrapicho rasteiro” (DISTASI, 2002), além de serem aclimatadas em muitas regiões áridas no Nordeste do Brasil. Estas duas espécies são economicamente importantes, porque aumentam os custos da produção agrícola na medida em que são ervas daninhas invasoras dos campos.

O xarope popular é confeccionado a partir de fragmentos radiculares, macerados em uma solução hidroalcoólica, e, a despeito da sua boa aceitação, o controle de qualidade não é garantido, por falta de uma correta identificação botânica e farmacognóstica do material vegetal usado no seu preparo.

O nome “espinho-de-cigano”, certamente é conseqüência das cerdas nos frutos e da sua capacidade de difusão, espalhando-se como nômade pelo mundo. Ainda se faz necessário a realização de mais estudos que garantam a identificação das duas espécies de *Acanthospermum* mais freqüentes, através de caracteres essenciais para um uso terapêutico seguro. Entretanto, a composição fitoquímica de cada espécie do gênero ainda não está totalmente elucidada e a possível

variação na qualidade e quantidade de seus componentes ativos pode resultar em variações da eficácia terapêuticas.

Este estudo analisa, comparativamente, os caracteres morfológicos, anatômicos e do macerado dos órgãos vegetativos de *Acanthospermum hispidum* DC., fornecendo auxílio adicional na identificação e controle para a obtenção da droga inteira, ou em pó. Adicionalmente, informações anatômicas e de macerado de *A. australe* complementam os dados de Martins *et al.* (2006), contribuindo para minimizar a possibilidade de erros na identificação botânica de ambas as espécies, de modo a qualificar cientificamente, seu uso como medicamento popular.

As duas espécies (*A. hispidum* e *A. australe*) apresentam um conjunto de dados descritos a seguir, que podem ser usados na caracterização e diferenciação de ambas.

4.1.1. Caracteres comuns

Ervas anuais, ramificadas e pubescentes; folhas inteiras, simples, opostas, pubescentes, sem apêndices; lâmina oval, peninérvea.

4.1.2. Caracteres específicos

Do que se observou *Acanthospermum hispidum* é ereta (50-90 cm de altura), com folhas sésseis e *A. australe* é prostrada com folhas pecioladas; a região basal da lâmina de *A. hispidum* é estreita, semelhante a um pecíolo alado. A margem é serreada. As inflorescências são masculinas e femininas em *A. australe*, femininas e hermafroditas em *A. hispidum*. Frutos aquênios elípticos (2,6-2,9 mm de largura), sementes elípticas em *A. australe* e triangulares (4,7-5,6 mm de comprimento e 2-2,4 mm de largura), sementes espatuladas em *A. hispidum*.

4.1.3. Sinonímia Científica

Acanthospermum acanthioides DC (COIMBRA, 1994),
A. brasilium (CRUZ, 1979)
***A. hispidum* DC**, Prodr. 5: 522, 1836 (ARANHA, 1972; SEPLANTEC, 1979)
A. humile Eggers (CORRÊA, 1978; LORENZI, 1982),
A. humile (Sw.) DC. (VIA RURAL, 2007),
A. humile var. *hispidum* (DC) Kuntze, 1891 (VIA RURAL, 2007),
A. xanthioides (LE COINT, 1947)
Melampodium humile Sw (VIA RURAL, 2007)

***Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze;**

A. brasilium Schrank, 1819 (CORRÊA, 1978, ARANHA, 1972);
A. hirsutum DC, 1836 (ARANHA, 1972);
A. obtusifolium DC, 1836;
A. xanthioides DC var. *acutifolium* DC Prodr 5:522, 1836 e var. *glabratum* DC. Prodr. 5:522, 1836 (ARANHA, 1972; CORRÊA, 1978; LE COINT, 1947);
Centrospermum xanthioides H.B.K., 1829 (ARANHA, 1972; CORRÊA, 1978);
Echinodium prostratum Foit, 1829 (ARANHA, 1972);
Melampodium australe Loef, 1891 (ARANHA, 1972; CORRÊA, 1978);
Oreya adhaerescens Vell, 1827 (ARANHA, 1972; CORRÊA, 1978).

4.1.4. Características Macroscópicas

Acanthospermum hispidum

Erva com 1 m de altura; **caule** e ramos densamente pubescentes, cilíndricos, verdes quando jovens e marrons na planta adulta. **Raiz** pivotante com 20 cm de profundidade, com leve aroma adocicado.

Folhas sésseis, inteiras, simples, opostas e pubescentes, sem apêndices; lamina oval, peninérvea; a forma é elíptica a oblonga e simétrica, aguda, atenuada na base, aguda a acuminada no ápice, margem inteira, ligeiramente sinuosa, a nervura principal é proeminente na face inferior, com 7 a 8 pares de nervuras laterais; o pecíolo é marginal, glabro, 4-7 mm de comprimento e 1-2 mm de largura. **Inflorescência** capítulo axilar, com pequenas flores amarelas, unissexuais. **Frutos** aquênios, com uma forma triangular, alongados, e cobertos por cerdas irregulares.

Acanthospermum australe

Erva com 20 cm de altura; **caule** prostrado e densamente ramificado, cilíndrico. **Raiz** pivotante com 20 cm de profundidade com forte odor adocicado. **Folhas** curto-pecioladas, inteiras, simples, opostas e pubescentes, sem apêndices; lâmina oval, peninérvea, com forma elíptica a oblonga e simétrica, aguda a atenuada na base, aguda a acuminada no ápice, margem serrada, com nervura principal proeminente na face inferior, e 7-9 pares de nervuras laterais; pecíolo com 2-3 mm de comprimento e 1 mm de largura. **Inflorescência** em capítulo axilar ou terminal com pequenas flores amarelas cobertas por brácteas membranáceas, unissexuais. **Frutos** aquênios com forma elíptica, alongados, e cobertos por cerdas irregulares.

A descrição morfológica de *A. australe* foi feita por Martins *et al.* (2006) e todos os caracteres foram confirmados neste estudo. A presença de um pecíolo extremamente curto nas folhas de *A. australe* a diferencia de *A. hispidum* (cf. Fig. 4.1).

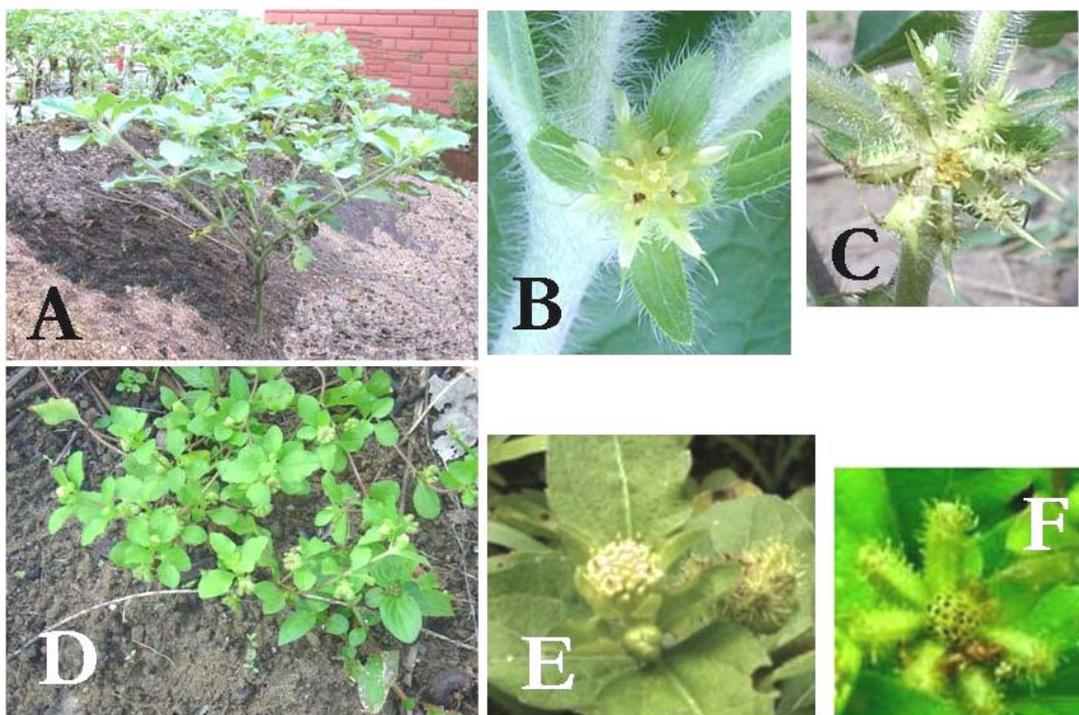


Figura 4.1. Aspectos dos dois gêneros: *Acanthospermum hispidum* (A - planta adulta, B - inflorescência axilar e C - frutos aquênios triangulares) e *Acanthospermum australe* (D - planta adulta, E - inflorescência terminal e F - frutos aquênios elípticos).

4.1.5. Características Microscópicas

4.1.5.1. Secções transversais

Acanthospermum hispidum

Raiz: É cilíndrica, sendo na estrutura primária revestida por uma epiderme uniestratificada, o córtex consiste de células parenquimatosas arredondadas e a região medular está composta de células de xilema primário. Na estrutura secundária está coberta por uma periderme, a região cortical quase exclusivamente consiste de células de periderme e a região medular está composta de células de xilema secundário (Fig. 4.2). Em ambas as estruturas, as células da endoderme mostram estrias de Caspary sem espessamento em “U”.

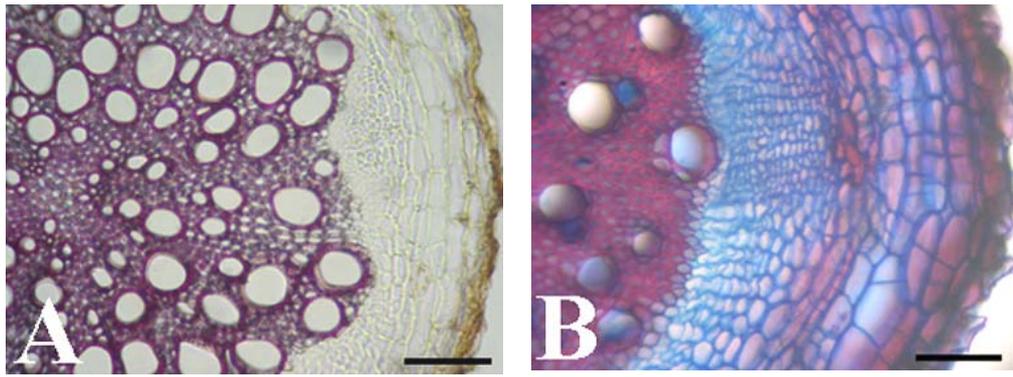


Figura 4.2. Vista transversal da Raiz (Estrutura Secundária) de *Acanthospermum hispidum* (A) e *A. australe*. Barras: 100 μ m (B).

Caule: É cilíndrico e coberto por uma epiderme unisseriada, com uma cutícula inconspícua e pêlos glandulares capitados, entre outros. Imediatamente sob a epiderme existe um colênquima angular. Feixes vasculares colaterais estão imersos em um parênquima fundamental e estão distribuídos em uma linha circular (Fig. 4.3A). Os feixes vasculares estão cobertos por um grupo de fibras, logo acima das células de floema. Na proximidade dos feixes vasculares há pequenos ductos secretores, próximos ao floema. O lúmen destes ductos está delimitado por um epitélio unisseriado, consistindo de cinco pequenas células achatadas (Fig.4.3B).

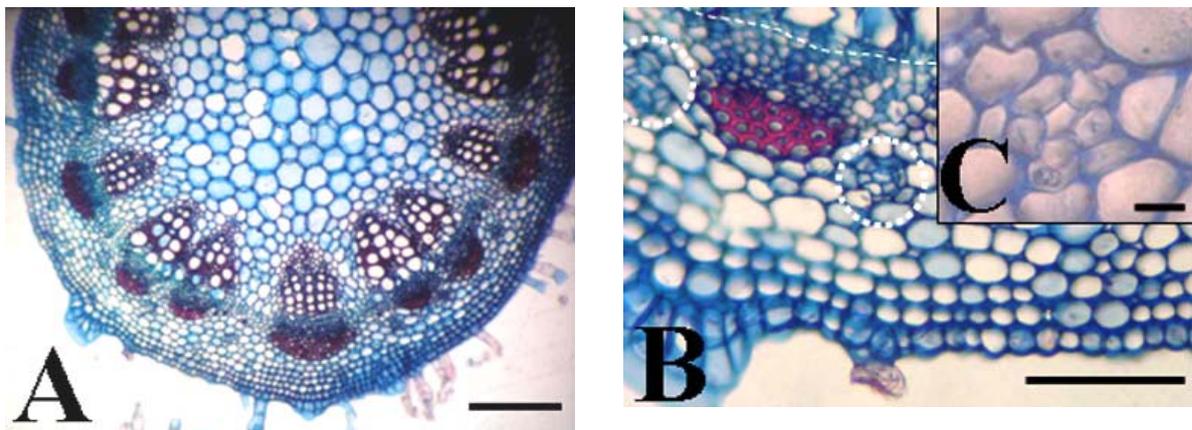


Figura 4.3. Vista transversal do caule (Estrutura primária) de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) (A), observando-se em B ductos secretores (círculo tracejado) entre feixes vasculares e atividade cambial (linha tracejada) e em C ductos secretores. Barras: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C: 50 μ m.

Folha: É dorsiventralmente achatada sem um pecíolo, com epiderme adaxial uniestratificada, com cutícula inconspícua. A epiderme inferior mostra estômatos localizados ligeiramente acima das demais células da epiderme. Há abundantes tricomas multicelulares, glandulares e capitados. O mesofilo é dorsiventral, com apenas uma camada de parênquima paliçádico (Fig 4.4A). As células do parênquima esponjoso estão localizadas próximas à epiderme abaxial, com 4-5 camadas de células densamente arranjadas, sem espaços intercelulares entre elas. A nervura principal, muito protuberante, em ambas as faces, é reforçada por colênquima angular. Três feixes vasculares colaterais estão imersos em um parênquima fundamental. Na proximidade destes feixes vasculares há pequenos ductos secretores próximos ao floema e xilema (Fig. 4.4A). O lúmen está delimitado por um epitélio unisseriado consistido por cinco pequenas células achatadas.

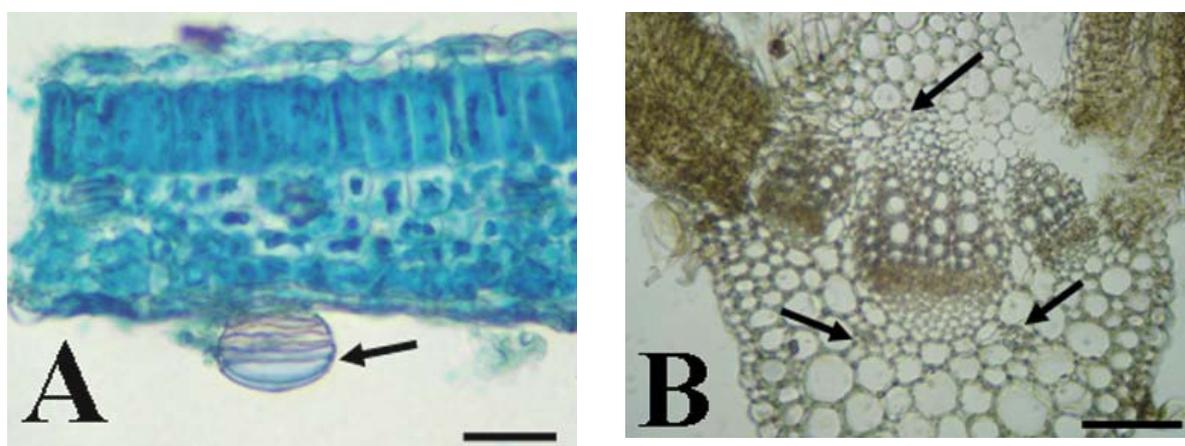


Figura 4.4. Folha de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): **A.** Mesofilo dorsiventral com pelo glandular (seta); em **B** Nervura principal com ductos secretores (setas) próximos aos feixes vasculares. Barras: **A:** 50 μm ; **B:** 100 μm .

4.1.5.2. Vista superficial da epiderme foliar

Há estômatos anomocíticos em ambas as faces (Fig. 4.5A,B), mais abundantes na face abaxial, e o comprimento polar medindo 23,67 e 27,04 μm , nas faces adaxial e abaxial, respectivamente. As células

epidérmicas de ambas as superfícies mostram paredes anticlinais sinuosas, mais acentuadas na face abaxial.

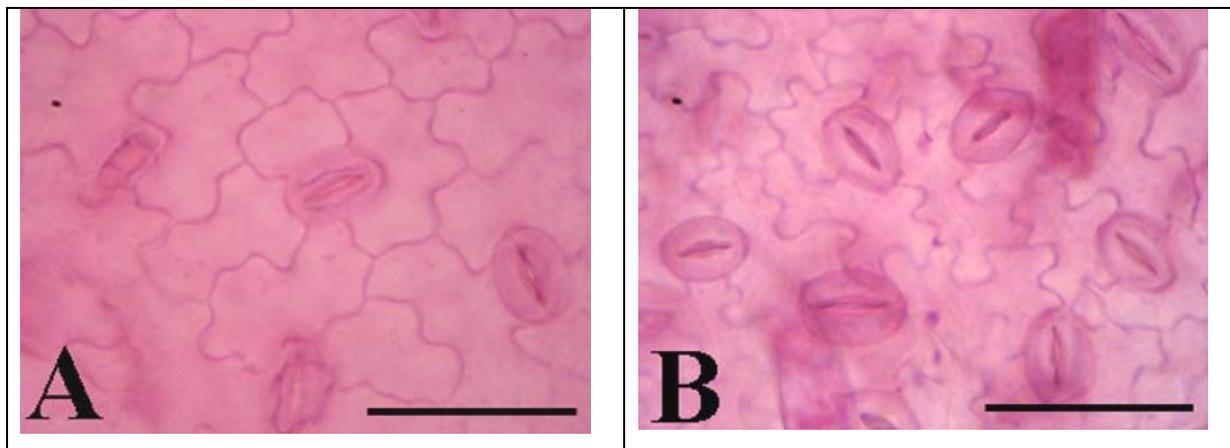


Figura 4.5 Vista frontal da folha de *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae). **A:** epiderme adaxial com estômatos anomocíticos. **B:** epiderme abaxial com estômatos anomocíticos. Barras: 50 μm .

Acanthospermum australe

Considerando a descrição morfoanatômica de *A. australe* em Martins *et al.* (2006), este estudo fez uma descrição complementar desta espécie acrescentando a anatomia da raiz e as descrições do macerado de todos os órgãos vegetativos desta espécie.

4.1.5.3. Anatomia do Pó da Droga

Acanthospermum hispidum

Raiz: A dissociação das células da raiz (Fig. 4.6) permitiu a determinação dos seguintes elementos celulares: **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas longitudinalmente, com 609,70 μm de comprimento e 19,57 μm de largura; **b) Células parenquimatosas:** células alongadas 81,45 μm de comprimento e 24,79 μm de largura; **c) Tipos de vasos de xilema: 1)** vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas (a) mais longas (252,05 μm) e mais curtas (142,03 μm) e largura similar (110,96 μm e 102,68 μm , respectivamente), **2)** vasos de xilema

com paredes terminais tangenciais com prolongamentos (b) com 505,58 μm de comprimento e 151,30 μm de largura, e 3) vasos de xilema com uma parede reta e outra transversa sem prolongamentos (c).

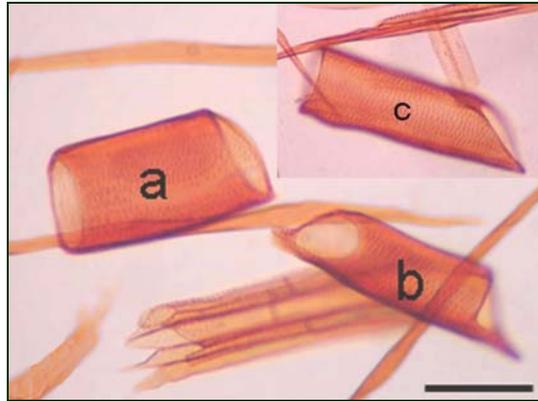


Figura 4.6. Células dissociadas da raiz de *Acanthospermum hispidum*. **a)** vasos com paredes terminais retas, **b)** vasos de xilema com paredes terminais tangenciais com prolongamentos, e **c)** vasos de xilema com uma parede reta e outra transversa sem prolongamentos. Barra: 100 μm

Acanthospermum australe

Raiz: A dissociação das células da raiz (Fig. 4.7) tornou possível a medição dos seguintes elementos celulares: **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas longitudinalmente, com 531,43 μm de comprimento e 18,15 μm de largura; **b) Células parenquimatosas:** células cúbicas medindo 69,70 μm de comprimento e 54,41 μm de largura; **c) Tipos de vasos de xilema:** 1) vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas medindo 408,62 μm de comprimento e 116,24 μm de largura, e 2) vasos de xilema com uma parede terminal reta e outra tangencial sem prolongamento, medindo 410,02 μm de comprimento e 115,74 μm de largura.

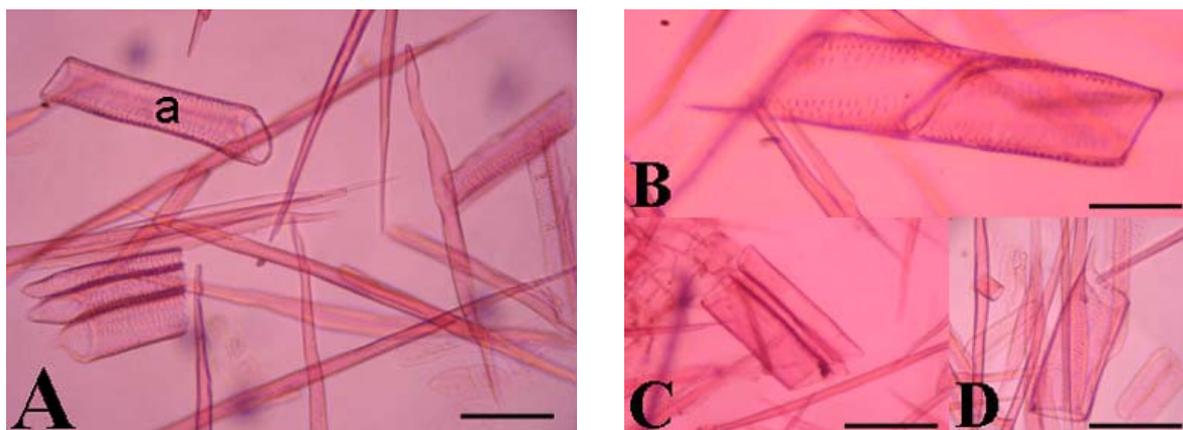


Figura 4.7. Células dissociadas da raiz de *Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze (Asteraceae). **A.** Vaso de xilema com uma parede reta e outra tangencial, sem prolongamento. **B.** Vaso de xilema com paredes terminais oblíquas, com prolongamentos. **C.** Vasos de xilema com paredes terminais retas. **D.** Vaso de xilema com uma parede reta e outra transversa com prolongamento. Barras: 100 μm .

Acanthospermum hispidum

Caule: A dissociação das células do caule (Fig. 4.8A-E) permitiu determinação dos seguintes elementos celulares: **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas longitudinalmente, 773,20 μm de comprimento e 16,15 μm de largura; **b) Células parenquimáticas:** células alongadas medindo 143,22 μm de comprimento e 92,82 μm de largura; **c) Tipos de vasos de xilema:** **1)** vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas mais longas (1190,47 μm), mais curtas (190,76 μm), comprimento e largura similares (20,00 μm e 28,37 μm , respectivamente), **2)** vasos de xilema com paredes terminais tangenciais com prolongamentos (a), e **3)** vasos de xilema com uma parede reta e outra transversa sem prolongamentos (b).

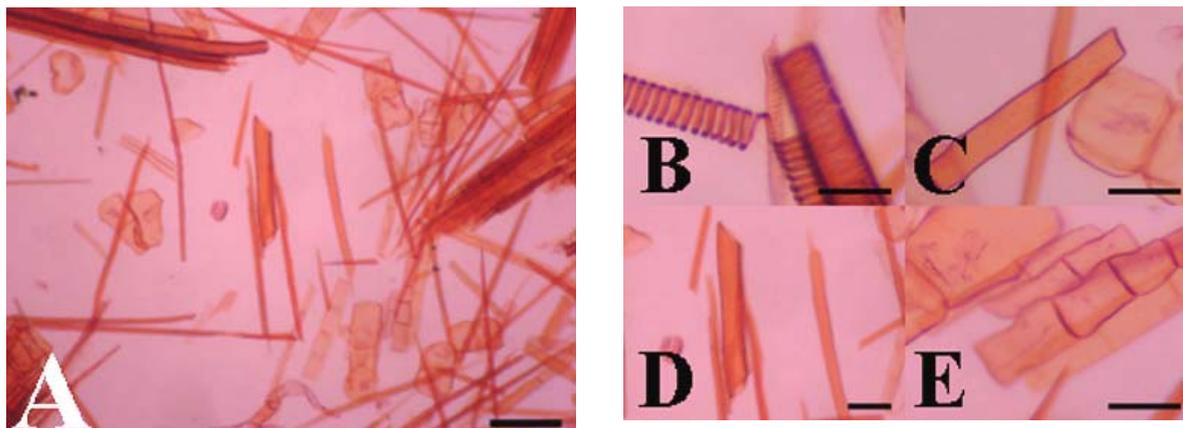


Figura 4.8. A. Células dissociadas do caule de *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae). B. Vasos de xilema com paredes retas e espessamento helicoidal. C. Vasos de xilema com paredes terminais retas. D. vasos de xilema com paredes terminais oblíquas. E. células de parênquima. Barras: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C,D,E: 50 μ m.

Acanthospermum australe

Caule: A dissociação das células do caule tornou possível a medição dos seguintes elementos celulares (Fig. 4.9): **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas longitudinalmente, com 437,49 μ m de comprimento e 20,76 μ m de largura; **b) Células parenquimatosas:** células alongadas medindo 322,80 μ m de comprimento e 158,11 μ m de largura; **c) Tipos de vasos de xilema: 1)** vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas, com 632,81 μ m de comprimento e 168,11 μ m de largura, e **2)** vasos de xilema com uma parede terminal reta e outra tangencial, sem prolongamentos, medindo 643,69 μ m de comprimento e 72,50 μ m de largura.

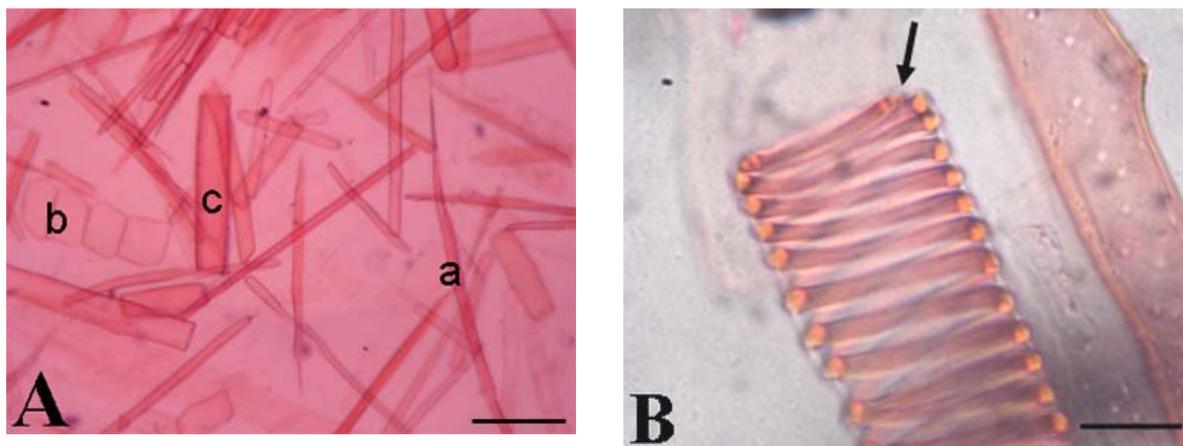


Figura 4.9. A. Células dissociadas do caule de *Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze (Asteraceae), mostrando fibras (a), células de parênquima (b) e vasos de xilema (c). B. Vaso de xilema com espessamento helicoidal (seta). Barras: A: 200 μ m; B: 20 μ m.

Acanthospermum hispidum

Folha: A dissociação das células da folha (Fig. 4.10) permitiu a determinação dos seguintes elementos celulares: **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas, 278,90 μ m de comprimento e 6,07 μ m de largura; **b) Células parenquimáticas:** células alongadas isodiametricamente, medindo 29,31 μ m de comprimento e 30,70 μ m de largura; **c) Tipos de vasos de xilema:** 1) vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas (a) mais longas (427,65 μ m), mais curtas (44,24 μ m), comprimento e largura similares (50,74 μ m e 102,68 μ m, respectivamente), 2) vasos de xilema com paredes terminais tangenciais com prolongamentos (b), e 3) vasos de xilema com uma parede reta e outra transversa sem prolongamentos (c).

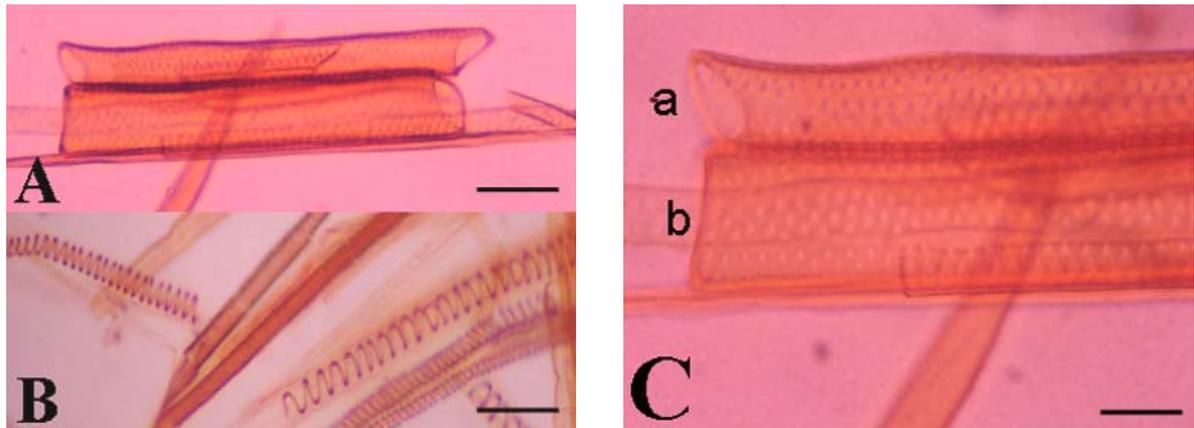


Figura 4.10. Células dissociadas da folha de *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae). **A.** Vasos de xilema. **B.** Vasos de xilema com espessamento de parede helicoidal. **C.** Vasos de xilema com paredes oblíquas (**a**) e retas (**b**). Barras: 20 μm .

Acanthospermum australe

Folha: A dissociação das células da folha (região mediana da lâmina e pecíolo) (Fig. 4.11) tornou possível a medição dos seguintes elementos celulares: **a) Fibras alongadas:** consistindo de células alongadas longitudinalmente, medindo 997,87 μm de comprimento e 31,08 μm de largura; **b) Células parenquimatosas:** células alongadas, medindo 75,85 μm de comprimento e 42,68 μm de largura; **c) Tipos de vasos de xilema: 1)** vasos de xilema com ambas as paredes terminais retas, medindo 311,35 μm de comprimento e 60,26 μm de largura, e **3)** vasos de xilema com ambas as paredes terminais tangenciais, com prolongamentos, medindo 538,54 μm de comprimento e 26,03 μm de largura.

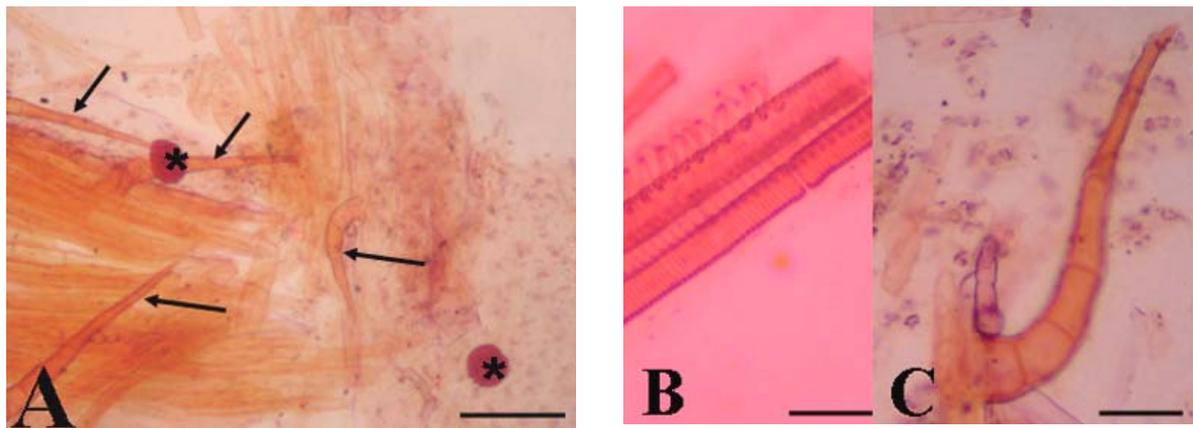


Figura 4.11. Células dissociadas da folha de *Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze (Asteraceae). **A.** Tricomas tectores (setas) e glandulares (*). **B.** Vasos de xilema com espessamento helicoidal. **C.** Tricoma tector. Barras: A: 200 μm ; B,C: 100 μm .

A dissociação das células da raiz, de ambas as espécies, mostra similaridades em relação ao tipo 1 e 2 das células do xilema, diferindo apenas no tamanho; em *A. australe* não foram encontrados vasos de xilema do tipo 3, isto é, as células com paredes terminais tangenciais com prolongamentos. O mesmo ocorreu no caule de ambas as espécies. Contudo, na folha, o tipo 2 não foi encontrado em *A. australe* e o tipo 3 não foi observado em *A. hispidum*. Estas podem ser características capazes de diferenciar estas espécies, quando analisando um pó da droga, de composição duvidosa.

4.1.5.4. Tricomas e estômatos em *Acanthospermum hispidum* e *A. australe*

O caule de ambas as espécies, e a folha de *A. hispidum*, em ambas as superfícies, mostram tricomas simples, unisseriados, de vários tamanhos, com uma célula apical aguda (Fig. 4.12A), e, também, diferentes tricomas glandulares. Em folhas de *A. australe*, os tricomas glandulares são sésseis e unicelulares com uma forma globular (Fig. 4.12B). Em folhas de *A. hispidum*, os tricomas glandulares são sésseis e multicelulares com uma forma globular (Fig. 4.12C). No caule de *A.*

hispidum, os tricomas glandulares pedunculados mostram 2-3 células no pedúnculo com uma célula vesicular globular no topo (Fig. 4.12D). Em contradição com Martins *et al.* (2006), tricomas sésseis, multicelulares e unisseriados, com uma forma globular, não foram encontrados nas folhas de *A. hispidum*.

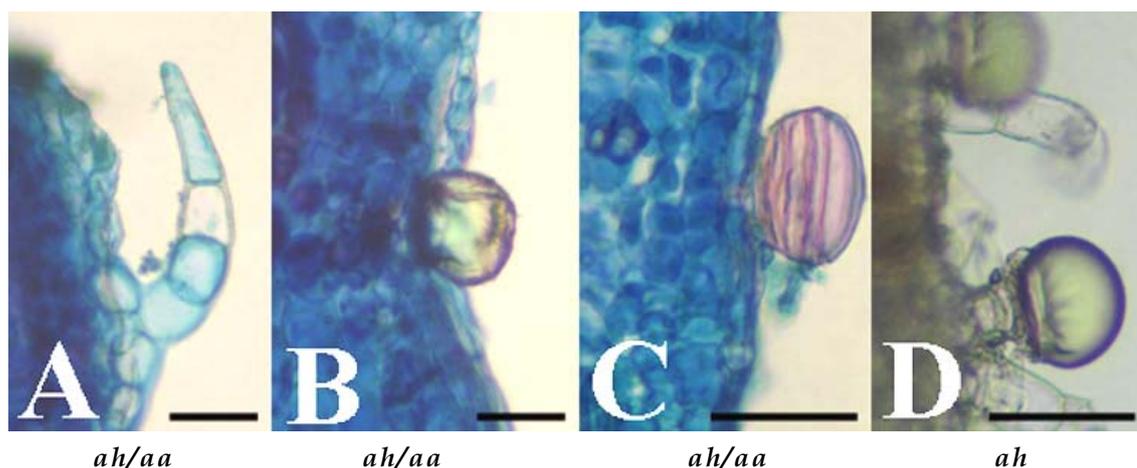


Figura 4.12. Tricomas em espécies de *Acanthospermum hispidum* (*ah*) DC. e *Acanthospermum australe* (*aa*) (Loef) O. Kuntze (Asteraceae). **A.** Tricomas tectores. **B, C, D.** Tricomas glandulares. Barras: 50 μm .

Tricomas são características importantes para distinguir estas espécies. A presença de tricomas sésseis e unicelulares, com uma forma globular no caule e folhas de *A. australe* e tricomas sésseis, glandulares e multicelulares, com uma forma globular em folhas de *A. hispidum*, e tricomas 2-3 pedunculados com uma célula vesicular globular no topo, são caracteres importantes de identificação, que diferenciam as duas espécies.

Acanthospermum hispidum mostra estômatos anomocíticos, em ambas as superfícies da folha, como *A. australe*. Contudo, estas estruturas têm diferentes tamanhos de comprimento polar, 23,67 e 27,04 μm em *A. hispidum* e, 40,57 e 45,00 μm em *A. australe*, nas superfícies adaxial e abaxial da folha, respectivamente.

Uma síntese dos principais caracteres diferenciais encontra-se relacionadas no Quadro 4.1 a seguir.

Quadro 4.1. Principais caracteres diferenciais entre as duas espécies do gênero *Acanthospermum*.

	<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Acanthospermum. hispidum</i>
Sinónima Científica	<p><i>A. australe</i> (Loef) O. Kuntze, 1891</p> <p><i>A. brasiliium</i> Schrank 1819</p> <p><i>A. hirsutum</i> DC. 1836</p> <p><i>A. obtusifolium</i> DC 1836</p> <p><i>A. xanthioides</i> DC. var. <i>acutifolium</i> DC. Prodr 5:522, 1836 e var. <i>glabratum</i> DC. Prodr. 5:522, 1836</p> <p><i>Centrospermum xanthioides</i> H.B.K. 1829</p> <p><i>Echinodium prostratum</i> Foit 1829</p> <p><i>Melampodium australe</i> Loef1891</p> <p><i>Oreya adhaerescens</i> Vell. 1827</p>	<p><i>A. acanthioides</i> DC</p> <p><i>A. brasiliium</i></p> <p><i>A. hispidum</i> DC. 1836</p> <p><i>A. humile</i> Eggers</p> <p><i>A. humile</i> (Sw.) DC.</p> <p><i>A. humile</i> var. <i>hispidum</i> (DC.) Kuntze1891</p> <p><i>A. xanthioides</i></p> <p><i>Melampodium humile</i></p>
Sinonímia vulgar	<p>Amor-de-negro (MG), Carrapichinho, Carrapicho-de-carneiro (MG), Carrapicho-miúdo, Carrapicho-rasteiro, Chifrinho, Cordão-de-sapo, Erva-tostão, Espinho-de-agulha (RS), Espinho-de-carneiro (RS), Fel-da-terra, Maroto, Mata-pasto (RS), Picão-da-praia, Poejo-da-praia.</p>	<p>Amor-de-negro (MG), Benzinho, Cabeça-de-boi (CE), Camboeiro (CE), Carrapicho-de-carneiro, Carrapicho-rasteiro (BA), Chifre-de-carneiro (PR), Chifre-de-veado (PR), Comboeiro (PE), Espinho-de-agulha, Espinho-de-carneiro, Espinho-de-cigano (PE), Federação (PE), Maroto, Retirante (CE), Picão-da-praia, Poejo-da-praia.</p>

Macroscópica

Porte	Prostrada, 20 cm	Ereta, 90 cm
Caule	Comprido e denso-piloso	Verde claro e densamente translúcido-piloso
Folhas	Curto-pecioladas, margem serreada, com nervura principal proeminente na face inferior, e 7-9 pares de nervuras laterais; pecíolo com 2-3 mm de comprimento e 1 mm de	Sésseis, margem inteira, ligeiramente sinuosa, nervura principal proeminente na face inferior, com 7-8 pares de nervuras laterais; pecíolo marginal, glabro, 4-7 mm de comprimento e 1-2 mm de largura.

largura.

Inflorescência	Capítulo axilar ou terminal	Capítulo axilar
Flores	Masculinas e femininas	Femininas e hermafroditas
Frutos	Aquênios elípticos (4,7-5,6 mm X 2-2,4 mm), cobertos por cerdas irregulares	Aquênios triangulares (2,6-2,9 mm de largura), cobertos por cerdas irregulares
Sementes	Elípticas	Espatuladas
Raiz	Pivotante com 20 cm de profundidade com forte aroma adocicado.	Pivotante com 20 cm de profundidade e leve aroma adocicado.

Pó da Droga

Raiz	Tipos de vasos de xilema: 1) vasos com ambas as paredes terminais retas, medindo 408,62 µm X 116,24 µm, e 2) vasos com uma parede terminal reta e outra tangencial, sem prolongamento, medindo 410,02 µm X 115,74 µm.	Tipos de vasos de xilema: 1) vasos de com ambas as paredes terminais retas mais longas (252,05 µm) e mais curtas (142,03 µm) e largura similar (110,96 µm e 102,68 µm, respectivamente), 2) vasos com uma parede reta e outra tangencial, sem prolongamentos, e 3) vasos com paredes terminais tangenciais com prolongamentos. medindo 505,58 µm X 151,30 µm.
Caule	a) Fibras: células alongadas, com 437,49 µm X e 20,76 µm; b) Células parenquimatosas: alongadas medindo 322,80 µm X 158,11 µm; c) Tipos de vasos de xilema: 1) vasos com ambas as paredes terminais retas, com 632,81 µm X 168,11 µm, e 2) vasos com uma parede terminal reta e outra tangencial, sem prolongamentos, medindo 643,69 µm X 72,50 µm.	a) Fibras: células alongadas, com 773,20 µm X 16,15 µm; b) Células parenquimáticas: alongadas, medindo 143,22 µm X 92,82 µm; c) Tipos de vasos de xilema: 1) vasos com ambas as paredes terminais retas, mais longas (1190,47 µm) e mais curtas (190,76 µm), similares na largura (20,00 µm e 28,37 µm, respectivamente), 2) vasos com paredes terminais tangenciais com prolongamentos, e 3) vasos com uma parede reta e outra tangencial, sem prolongamentos.
Folha	a) Fibras: células alongadas, com 997,87 µm X 31,08 µm; b) Células parenquimatosas: alongadas, com 75,85 µm X 42,68	a) Fibras: células alongadas, 278,90 µm X 6,07 µm; b) Células parenquimáticas: alongadas isodiametricamente com 29,31 µm X 30,70

µm;

c) Tipos de vasos de xilema: 1) vasos com ambas as paredes terminais retas, medindo 311,35 µm X 60,26 µm, e **3)** vasos com ambas as paredes terminais tangenciais, com prolongamentos, medindo 538,54 µm X 26,03 µm.

µm;

c) Tipos de vasos de xilema: 1) vasos com ambas as paredes terminais retas, mais longas (427,65 µm), mais curtas (44,24 µm), comprimento e largura similares (50,74 µm e 102,68 µm, respectivamente), **2)** vasos com paredes terminais tangenciais com prolongamentos, e **3)** vasos com uma parede reta e outra tangencial sem prolongamentos.

Tricomas

Caule	sésseis e unicelulares, com forma globular	tricomas 2-3 pedunculados com uma célula vesicular globular no topo e glandulares com 2-3 células no pedúnculo e 1 célula vesicular globular no topo.
Folha	sésseis e unicelulares, com forma globular	tricomas sésseis, glandulares e multicelulares, com uma forma globular

4.1.5.5. Análise histoquímica de *A. hispidum*

Os testes histoquímicos confirmam a presença de amido, identificada pela cor azul escuro nas células do mesofilo de *A. hispidum*, não observada na raiz e caule. A lignina foi evidenciada pela cor vermelha nos vasos de xilema e fibras de esclerênquima. A ausência de cor específica indicou a ausência de iridóides, alcalóides, lipídios, cutina e suberina, além de protoantocianidinas (taninos) nas células da raiz (cf. Quadro 4.2).

Quadro 4.2: Resultados de histoquímica em *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae).

Testes histoquímicos	Raiz	Caule	Folha
----------------------	------	-------	-------

Alcalóide	ausente	ausente	ausente
Compostos fenólicos	presente (súber)	presente (colênquima)	presente (mesofilo)
Lipídios, cutina e suberina	ausente	ausente	ausente
Amido	ausente	ausente	presente (mesofilo)
Lignina	presente (fibras e vasos de xilema)	presente (fibras e vasos de xilema)	presente (fibras e vasos de xilema)
Proantocianidinas	ausente	ausente	ausente
Iridóides	ausente	ausente	ausente

4.1.6. Discussão

Diferentes indivíduos de *A. hispidum* mantêm seus caracteres morfológicos, mesmo quando crescendo sob diferentes condições ambientais, o que facilita seu adequado reconhecimento por ocasião da coleta de matéria-prima. A ausência de um pecíolo nas folhas desta espécie é um dos primeiros caracteres diagnósticos que conferem segurança quanto a uma coleta de material botânico para a elaboração de qualquer fitoterápico que inclua esta planta em sua composição.

As publicações acerca da anatomia dos órgãos vegetativos de algumas espécies da família Asteraceae (KANDEMIR *et al.*, 2006; METCALFE & CHALK, 1965; ESAU, 1965) mostram a existência de um grande número de caracteres comuns. Entretanto, o presente estudo identificou aspectos anatômicos diagnósticos para a espécie *Acanthospermum hispidum*, os quais, associados à análise histoquímica, se revelaram capazes de garantir uma identificação botânica segura para a espécie.

Ductos secretores similares, todos próximos aos feixes vasculares no cilindro vascular e, próximos à nervura principal da lâmina foliar, foram sempre delimitados por um epitélio unisseriado constituído por

cinco células achatadas periclinalmente (Fig. 4.1 B e C). É uma estrutura comum a muitas espécies da tribo Helianthae, como em *Baccharis gaudichaudiana* DC. (BUDEL *et al.*, 2003) e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) (FONSECA *et al.*, 2006). Estas estruturas ocorrem no caule e folhas de *A. hispidum*; se localizando, nas folhas, no parênquima da nervura principal. De acordo com Fahn (1990), os ductos são estruturas que podem produzir substâncias muito diferentes como taninos, óleos essenciais e resinas, visando defender a planta contra patógenos. Espindola (2006) afirmou que a proximidade destes ductos aos feixes vasculares pode ajudar na manutenção das altas taxas metabólicas. Ductos resiníferos são comuns na raiz e caule de espécies de Asteraceae e auxiliam na identificação taxonômica (METCALFE & CHALK, 1965). Canais de látex, observados em alguns membros de Asteraceae (ESAU, 1965), não são encontrados em *A. hispidum*.

Em Asteraceae o mesofilo é completamente paliçádico ou esponjoso (METCALFE & CHALK, 1950). Espécimes de *A. hispidum* apresentam o mesofilo sempre dorsiventral, diferente das informações de Kandemir *et al.*, (2006), Metcalfe & Chalk (1950) e Esau (1965).

Estes dados são necessários, não apenas para a identificação botânica da espécie que garanta a utilização do material em pó, mas, também, para os padrões de controle de qualidade exigidos pela legislação em saúde. Estudos acerca da descrição botânica, incluindo parâmetros macro e microscópicos, são ferramentas úteis para determinar os caracteres anatômicos adequados como identificadores de certas plantas evitando assim, falsificações ou adulterações no processo de comercialização de seus produtos derivados.

Os diferentes tipos celulares caracterizados após dissociação apresentaram valores de comprimento e largura variáveis. Os vasos de xilema do tipo 1 apresentam células mais longas (252,05 µm) e células mais curtas (142,03 µm) com valores médios de largura muito semelhantes (110,96 e 102,68 µm, respectivamente).

As informações disponíveis na literatura acerca da morfologia e anatomia de espécies de *Acanthospermum* não se referem à raiz. Dentre os estudos relativos às Asteraceae, destacam-se os estudos de Felipe & Alencastro (1966), relativos à nervação foliar, e o de Filizola *et al.* (2003), tratando da anatomia dos órgãos vegetativos de *Vernonia brasiliiana*. Considerando o gênero *Acanthospermum*, apenas Martins *et al.* (2006) estudaram a anatomia do caule e folha de *A. australe*.

Dados da literatura não mencionam informações sobre a raiz de nenhuma espécie de *Acanthospermum*; Martins *et al.* (2006) realizaram o único estudo sobre a anatomia do caule e folha de *A. australe*. Até o momento não foram encontradas referências ao macerado do pó da droga e histoquímica das principais classes de metabólitos para espécies de *Acanthospermum*. Em consequência, a caracterização da morfologia da planta, do pó da droga e da histoquímica de *A. hispidum* é inédita.

4.2. FARMACOQUÍMICA

4.2.1. Padronização da matéria-prima de *Acanthospermum hispidum*

4.2.1.1. Testes de pureza

Todos os testes de pureza realizados ficaram dentro das normas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira e WHO (1998).

4.2.1.2. Determinação da perda por dessecação

No ensaio da perda por dessecação, o resultado obtido (11%) encontra-se dentro do valor recomendando para raízes 8 a 14% o que reduz o ataque por fungos, bactérias e enzimas (OLIVEIRA *et al*, 1998).

4.2.1.3. Teor de cinzas totais

Para o teor de cinzas o percentual foi de 8,21%.

4.2.1.4. Cinzas insolúveis em ácido

O teor de cinzas insolúvel em ácido clorídrico foi de 0,37%.

4.2.2. Perfil fitoquímico dos extratos brutos de raiz, caule e folha

Em relação à prospecção fitoquímica das raízes evidenciou-se a presença de um elevado teor de mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, açúcares redutores e derivados cinâmicos, com a identificação de estigmasterol, β -sitosterol e carvacrol. Saponinas foram identificadas apenas nas folhas, onde foram também encontrados fenilpropanóides e alguns flavonóides. Não foram detectados no vegetal; alcalóides, cumarinas, nem proantocianidinas. Esses resultados estão em parte, de acordo com a literatura, quanto ao perfil fitoquímico encontrado no gênero *Acanthospermum* (Quadro 3.3, página 28). No entanto, a presença de algumas substâncias como cumarina e flavonóides descrita nas raízes não foi confirmada no atual trabalho. No Quadro 4.3 encontram-se relacionadas as substâncias identificadas, nas amostras das duas espécies de *Acanthospermum* da região, por parte da planta.

Quadro 4.3. Metabólitos identificados nos extratos das duas espécies de *Acanthospermum*, em diferentes órgãos vegetativos.

Metabólitos	<i>A. hispidum</i>			<i>A. australe</i>		
	raiz	caule	folha	raiz	caule	folha
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Mono/Sesquiterpenos	+	+	+	++	+	++
Triterpenos/Esteróides	++	+	+	+	+	+
Iridóides	-	-	-	-	-	-
Açúcares redutores	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	±	+	+	+	+	+
Proanto/Leucoantocianidina	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Derivados cinâmicos	+	+	+	+	+	+
Fenilpropanóides	-	-	-	-	-	-

4.2.2.1. Caracterização de Derivados Cinâmicos

A hidrólise ácida das raízes da planta foi efetuada com a finalidade de caracterizar os derivados cinâmicos, substâncias com fluorescência azul clara a 365 nm, correspondendo ao esperado para derivados do ácido caféico. Este, não aparece no extrato bruto metanólico (EBM), antes da hidrólise, sugerindo a presença de derivados daquele ácido (Fig. 4.13).

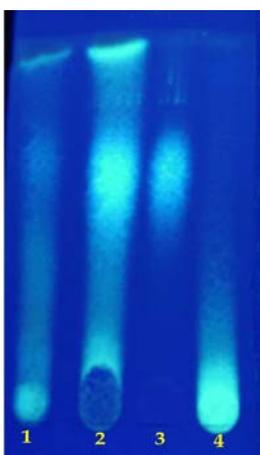


Figura 4.13. Cromatografia em camada delgada de extratos bruto e hidrolisado, em celulose, com fase móvel de acetato de etila 2%: **1)** extrato bruto de *Acanthospermum hispidum*, **2)** hidrolisado **3)** padrão de ácido caféico e **4)** padrão de verbascosídeo.

4.2.3. Extração, Isolamento e Identificação

A fração isolada na coluna cromatográfica, denominada EA1 foi submetida a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), cujos dados espectrais mostraram ampla correspondência com o estigmasterol (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Resultado experimental de RMN ^1H e ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3) para estigmasterol, comparados com a literatura.

	Estigmasterol				Literatura	
	HMQC		HMBC		δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$		
C						
5	140.76	-	2H-4	2H-7; 3H-19	140.7	-
10	36.51	-	3H-19	2H-4; H-6	36.1	-
13	42.22	-	3H-18		42.2	-
CH						
3	71.81	3.53 (m)	2H-4		71.7	3.50 (m)
6	121.71	5.35 (m)		2H-4	121.7	5.30 (m)
8	31.90			H-6	31.9	
9	50.16			3H-19	50.1	0.93
14	56.77			3H-18	56.0	1.04
17	55.96			3H-18; 3H-21	56.7	1.10
20	40.48		3H-21; H-22	H-23	36.5	1.38 (m)
22	138.31	5.01 (dd, 15.1, 8.6)		3H-21	-	-
23	129.29	5.15 (dd, 15.1, 8.5)			-	-
24	51.23		H-23	H-22; 3H-26; 3H-27; 3H-29	45.8	
25	31.88		3H-26; 3H-27		29.1	1.73
CH₂						
1	37.26			3H-19	37.2	
2	39.69				37.6	
4	42.31	2.29 (m)		H-6	42.3	2.25 (m)
7	31.67				31.9	1.51 (m)
11	21.07				21.1	
12	39.69			3H-18	39.7	
15	24.36				24.3	
16	28.91				28.2	
22	-	-	-	-	33.9	
23	-	-	-	-	26.0	1.19
28	25.39		3H-29		23.0	1.26
CH₃						
18	12.04	0.69 (s)			11.8	0.64 (s)
19	19.39	1.01 (s)			19.4	1.02 (s)
21	21.21	1.02 (d, 7.6)			18.8	0.91
26	18.90	0.81 (d, 6.8)		3H-27	19.4	0.82
27	21.08	0.84 (d, 6.7)		3H-26	19.8	0.81
29	12.24	0.80 (t, 6.8)			12.0	0.84

EA2 foi identificada efetuando-se uma co-cromatografia com padrão autêntico de β -sitosterol em dois tipos de placas cromatográficas de fornecedores diferentes. Sendo a primeira a mais polar (Macherey-Nagel Art. 818133), foi usado o sistema tolueno/acetato de etila (90:20), enquanto para a segunda (Merck, Alemanha, Art. 105554) a razão desses componentes foi 90:10. A outra fase móvel utilizada foi clorofórmio/metanol (90:5 e 90:2). Em todas, os valores de Rf, coloração no visível após aplicação do reagente de Liebermann e coloração da fluorescência no ultravioleta (365 nm) foram idênticos.

Os esteróides caracterizados diferenciam-se primordialmente pela posição da dupla ligação nos carbonos 22-23 no estigmasterol (Fig. 4.14).

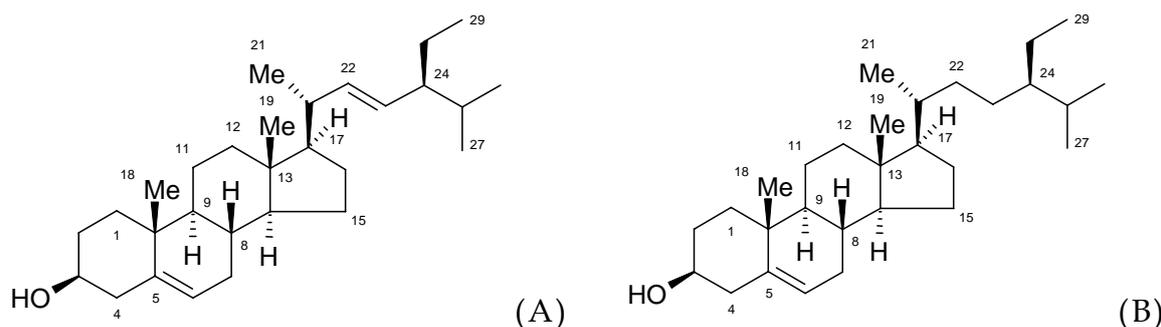


Figura 4.14. Estrutura das moléculas de estigmasterol (A) e β -Sitosterol (B) presentes em *Acanthospermum hispidum*.

Normalmente são isolados numa mistura; aqui o isolamento de cada uma das moléculas foi conseguido devido à grande quantidade no vegetal, principalmente do estigmasterol, que forneceu 730 mg (0,28%). Em CCD este apresentou uma coloração azul quando revelado com vanilina sulfúrica e laranja com Lieberman-Burchard. O β -sitosterol por sua vez, apresentou coloração azul quando revelada com vanilina sulfúrica e rosa, com Liebermann-Burchard, ambas apresentando um mesmo valor de Rf.

4.3. ESTUDO FARMACOERGÁSTICO

4.3.1. Sazonalidade

Nossas observações corroboram aquelas já evidenciadas por Miranda (1996), que, de fato, *A. hispidum* não mostrou variações relevantes na sua fitoquímica em diferentes fenofases. Este aspecto, aliado ao seu fácil manuseio, permite uma disponibilidade durante as várias estações do ano (Fig. 4.15).

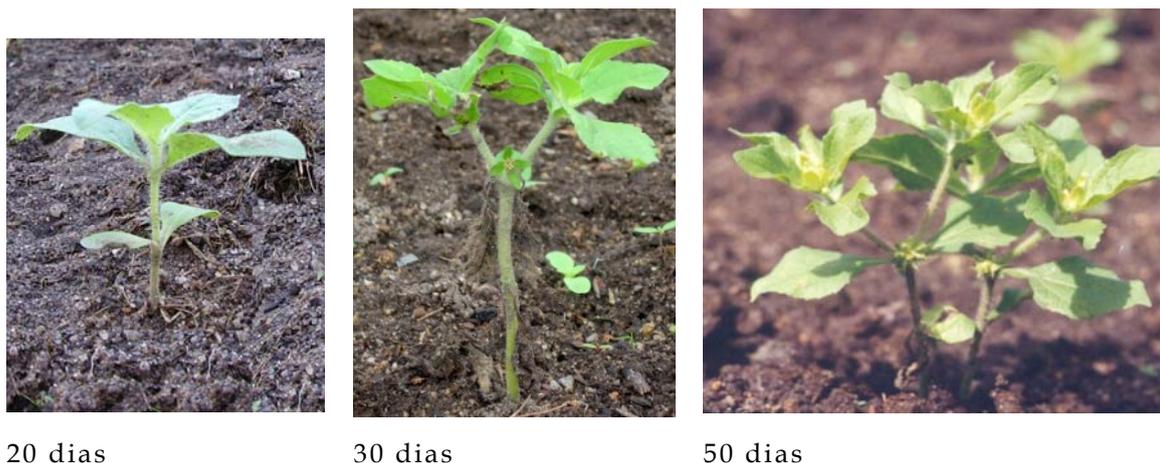


Figura 4.15. Fases de crescimento de *Acanthospermum hispidum* a partir da germinação

4.3.2. Variação geográfica

Nas amostras colhidas nas três regiões geográficas estudadas (Zona da Mata, Agreste e Sertão), não foram observadas diferenças entre as substâncias consideradas como marcadores.

4.3.3. Desenvolvimento do Cultivo

O fato de que *A. hispidum* seja encontrada na natureza principalmente como uma espécie invasora de culturas e a sua ocorrência restrita aos períodos chuvosos, levou à tentativa de cultivo, baseada na observação da sua ocorrência espontânea, sempre nos mesmos locais. O resultado deste trabalho foi a oferta de matéria-prima durante todo o ano, sem alterações fitoquímicas (Fig. 4.16).



Figura 4.16. Canteiros com plantas transplantadas após 25-30 dias de germinadas (Olinda/PE, 2004).

CAPÍTULO V

ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

5. ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM* PELO MÉTODO DPPH - MÉTODO DO RADICAL LIVRE DPPH• (1,1,-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL)

Nos resultados obtidos não foi observada atividade antioxidante *in vitro*.

5.2. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM*

A principal indicação medicinal da espécie estudada é para o tratamento das bronquites asmáticas, aonde uma possível atividade antimicrobiana viria a acrescentar mais potencialidades na utilização de *Acanthospermum hispidum*.

O estudo de atividade antimicrobiana mostrou uma discreta efetividade do extrato bruto metanólico das raízes, frente aos microrganismos testados: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis* e *Cândida albincas*. Não havendo, no entanto, atividade frente aos microrganismos: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus faecalis*. Os padrões utilizados foram Kanamicina (30µg/disco) e Cetoconazol (300µg/disco) A inibição do extrato bruto da planta e dos padrões para os microrganismos testados são observados na Fig 5.1.

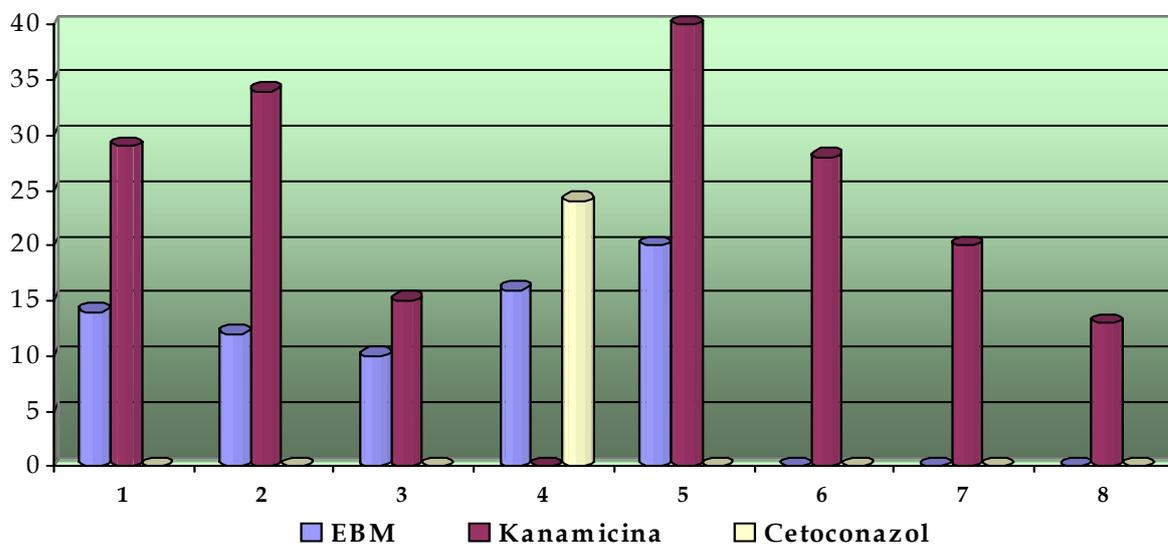


Figura 5.1. Atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Acanthospermum hispidum* frente às cepas: **1)** *Bacillus subtilis*; **2)** *Micrococcus luteus*; **3)** *Serratia marcescens*; **4)** *Candida albicans*; **5)** *Mycobacterium smegmatis*; **6)** *Staphylococcus aureus*; **7)** *Pseudomonas aeruginosa* e **8)** *Enterococcus faecalis*.

5.3. DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE ACANTHOSPERMUM HISPIDUM

Na determinação da CMI sobre *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis* obteve-se como resultado a inibição do crescimento dos microrganismos (halos variando, nas triplicatas de 14 a 17 mm para a primeira e de 18 a 23 mm no segundo caso), nas concentrações de 250µg/mL e 1000µg/mL, respectivamente. Estes resultados demonstram que, no caso da *C. albicans*, a CMI apresenta valor considerado significativo (HOLETZ *et al.*, 2002).

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM*

Como uma complementação dos estudos toxicológicos foi estudada a atividade citotóxica em células cancerígenas e não-cancerígenas. O valor da CI_{50} igual a 673 $\mu\text{g/mL}$ para as células NCI-H292 não representa um valor significativo de citotoxicidade, visto que segundo o Instituto Nacional do Câncer (GERAN, 1972), dos Estados Unidos da América do Norte, para produtos de origem vegetal só são considerados significativos valores $\leq 30 \mu\text{g/mL}$.

Por outro lado, o valor da CI_{50} do produto frente às células HEP-2 e células VERO não pôde ser determinado em virtude da total ausência de citotoxicidade. Valores médios de inibição, em qualquer das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$), não apresentaram diferenças, não sendo possível a determinação da CI_{50} .

5.5. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA PULMONAR DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM*

A reação inflamatória com seus típicos sinais (calor, dor, rubor e edema) é conseqüência da liberação de produtos bioativos tais como: prostaglandinas, leucotrienos, FNT (fator de necrose tumoral) e interleucinas, entre outros. Nestes casos o recrutamento de leucócitos resulta em migração unidirecional de células inflamatórias, principalmente, neutrófilos e monócitos. Esta é a base do presente ensaio, onde são realizadas as contagens total e diferencial destas células inflamatórias, após estímulo com 1 mg/kg de peso de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) com conseqüente migração celular para os alvéolos pulmonares.

5.5.1. Contagem total de células

Após análise estatística observa-se que o grupo tratado com o extrato da planta (EBM) foi comparado, primeiramente ao grupo controle (com uso apenas de solução salina), e depois ao grupo tratado com dexametasona. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Aplicando-se o teste de Mann-Whitney, não houve diferenças significativas de ação entre os três grupos, apesar de o grupo EBM ter apresentado contagem um pouco menor de células totais. O desvio padrão (p) encontrado entre os grupos foi: Controle x EMB = 0,432 e entre EMB x Dexametasona = 0,832, todos sem diferença significativa, conforme se pode observar na Figura 5.2.

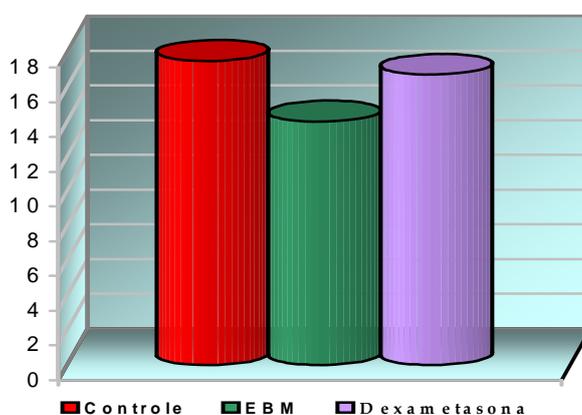


Figura 5.2. Gráfico representativo da **contagem total de células** inflamatórias de lavado broncoalveolar em ratos, usando extrato de *Acanthospermum hispidum*, comparativamente com um grupo controle (salina) e um grupo com dexametasona. Os valores de “p” foram: Controle x Extrato = 0,432 e Extrato x Dexametasona = 0,832.

5.5.2. Contagem diferencial de Células

Neutrófilos - Em relação aos neutrófilos, as principais células envolvidas no processo inflamatório, embora a dexametasona tenha sido significativamente mais potente ($p = 0,017$) que o EBM em inibir o recrutamento destas células para o pulmão, também houve uma significativa ação do EBM em relação ao grupo controle ($p=0,04$), conforme se pode observar na Fig. 5.3.

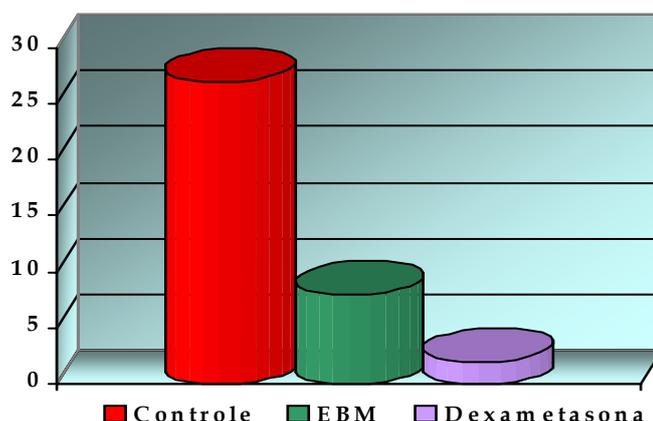


Figura 5.3. Gráfico representativo da contagem diferencial de neutrófilos em lavado broncoalveolar de ratos tratados com *Acanthospermum hispidum* comparativamente com grupo controle e grupo tratado com dexametasona. Os valores de “p” foram: Controle x EBM = 0,04 e EBM x Dexametasona = 0,017.

Eosinófilos - A contagem diferencial dos eosinófilos, que estão envolvidos nas reações alérgicas, nos grupos, tratado com EBM, controle e dexametasona, aplicado o Teste Mann-Whitney, mostrou diferença significativa entre os grupos Controle x EBM ($p = 0,04$), porém, não significativa entre os grupos EMB x Dexametasona ($p = 0,41$), conforme se pode observar na Fig. 5.4.

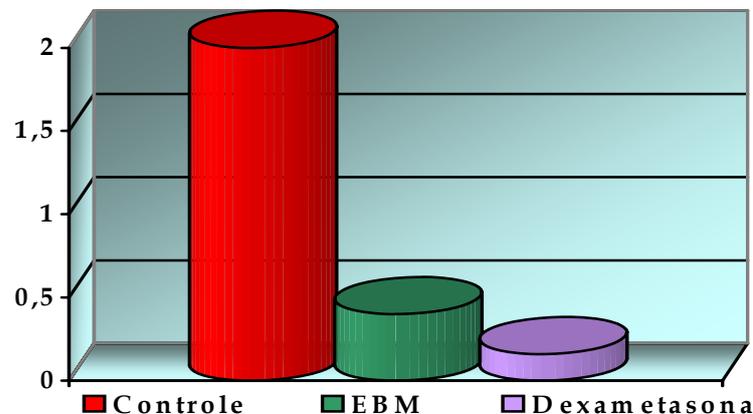


Figura 5.4. Gráfico representativo da contagem diferencial de eosinófilos em lavado broncoalveolar de ratos tratados com *Acanthospermum hispidum* comparativamente com grupo controle e grupo tratado com dexametasona. Os valores de “p” foram: Controle x EBM = 0,04 e EBM x Dexametasona = 0,41.

Do exposto se pode resumir que, apesar de os valores da contagem de células totais terem sido um pouco menor no grupo EBM, as diferenças não foram significativas entre os três grupos. Porém, se observa uma inibição seletiva da migração de neutrófilos, com diferenças significativas entre os grupos EBM X Controle ($p = 0,04$), da mesma forma que ocorre com a contagem de eosinófilos, também com significância entre EBM X Controle ($p = 0,04$), porém não significativa entre EBM e Dexametasona ($p = 0,41$), o que aproxima ação inibidora do processo nesses dois grupos.

CAPÍTULO VI

FARMACOTÉCNICA

6. FARMACOTÉCNICA⁴

A escolha da forma farmacêutica do xarope como apresentação do fitoterápico nos pareceu uma boa opção, para administração, sobretudo em crianças e idosos, em virtude da incapacidade que alguns pacientes encontram em deglutir formas farmacêuticas sólidas. De acordo com a definição, soluções são preparações líquidas, que contém uma ou mais substâncias químicas, dissolvidas num solvente adequado, ou numa mistura de solventes mutuamente miscíveis (ANSEL, 2000, USP 23).

Dentre os aditivos utilizados nos xaropes, encontram-se os antimicrobianos (ácido benzóico 0,1- 0,2%, benzoato de sódio 0,1-0,2%, e combinações diversas dos parabenos, seja o metil, propil ou butil num total de aproximadamente 0,1%), os flavorizantes (sejam sintéticos ou naturais, que servem para dar sabor à preparação), os corantes (utilizados para tornar a preparação mais atraente). Outros aditivos podem ser utilizados, se necessário, como solventes especiais, agentes solubilizantes, espessantes, entre outros, sendo importante tanto a estabilidade física, quanto química das soluções, nos seus devidos recipientes. Uma solução deve manter sua limpidez, cor, aroma, sabor e viscosidade iniciais durante seu tempo na prateleira.

Baseada no uso popular de *A. hispidum*, o xarope foi desenvolvido pela equipe da Prefeitura Municipal de Olinda, há quase duas décadas, constituindo-se na primeira tentativa de padronização de uma forma farmacêutica para oferta à população, atendida na rede de saúde. Algum tempo depois, já era possível encontrá-lo em serviços públicos de vários outros municípios, ao mesmo tempo em que apareciam os primeiros produtos comerciais, fabricados artesanalmente por particulares (cf. Fig. 6.1), despertando o interesse pelo estudo comparativo entre estes vários produtos, utilizando como padrão uma amostra confeccionada em Olinda.

⁴ De acordo com a RDC 01/2005 - ANVISA



Figura 6.1.: Produtos contendo *Acanthospermum hispidum*: 1 a 4 produtos comercializados na Região Metropolitana do Recife (2007) e 5 xarope-padrão.

6.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PRODUTOS DO MERCADO

6.1.1. Propriedades Organolépticas

A grande diversidade de produtos encontrados sem nenhuma dificuldade no comércio de Recife levantou a possibilidade de comparação entre eles. Assim, foram separadas cinco porções de amostras de produtos manipulados com *A. hispidum* onde foram observados aspectos de limpidez e coloração (Fig. 6.2).



Figura 6.2.: Coloração e transparência dos produtos de *Acanthospermum hispidum* (1 a 4) comercializados na Região Metropolitana do Recife (2007) e xarope-padrão (5).

A variação nas propriedades organolépticas é provavelmente devida aos diferentes componentes, como alho, cravo da Índia, própolis, etc., utilizados pelos diferentes fabricantes (Quadro 6.1).

Quadro 6.1.: Propriedades organolépticas dos produtos de *Acanthospermum hispidum* encontrados na Região Metropolitana do Recife

Produtos	Coloração	Aroma	Sabor
1	Amarelo-claro transparente	Abacaxi	Abacaxi
2	Marrom-claro turvo	Alho	Alho
3	Amarelo-claro transparente	Própolis	Própolis/mel
4	Marrom escuro	Cravo da Índia	Cravo da Índia
5	Marrom	Alho	Alho

1 a 4 produtos comercializados em Recife e 5 xarope-padrão

6.1.2. Testes Físico-químicos

Testes físico-químicos de viscosidade, densidade e medida de pH, também foram realizados com os mesmos produtos, sendo os resultados apresentados no Tabela 6.1 a seguir:

Tabela 6.1.: Propriedades físico-químicas de xaropes de *Acanthospermum*

Produto	pH	Viscosidade	Densidade
1	4,28	53,6	1,2456
2	5,52	76,1	1,2514
3	4,77	67,1	1,2583
4	5,62	108,0	1,2896
5	5,95	189,4	1,2792

De 1 a 4 Produtos comerciais e 5 xarope-padrão

Nos parâmetros físico-químicos comparativamente com o xarope-padrão a variação do pH foi mais evidente na amostra de nº. 1; em relação à viscosidade, apenas a amostra nº. 4 se aproximou do xarope-padrão, enquanto na densidade houve uma uniformidade nas leituras. A análise quantitativa, não foi realizada, uma vez que o método para o doseamento de esteróides como marcadores para os xaropes, não foi ainda validado.

6.2. CONTROLE DE QUALIDADE DOS XAROPES

6.2.1. Análise por Cromatografia em Camada Delgada

O controle de qualidade dos xaropes foi realizado através de comparação qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se os marcadores esteroidais isolados (β -sitosterol e estigmasterol). Os resultados não foram totalmente esclarecedores devido à diversidade de coloração nas manchas cromatográficas reveladas, pela composição variada dos xaropes comerciais, como se pode observar na Figura 6.3. Através da CDD o que mais se assemelha ao xarope-padrão (5) é a amostra nº. 3.

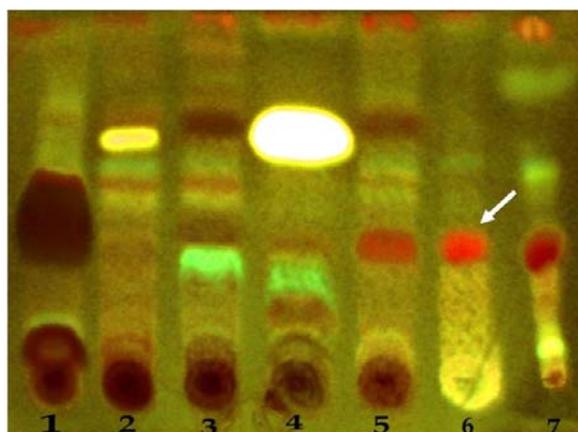


Figura 6.3. Cromatograma das amostras de xaropes comerciais (1 a 4) e xarope padrão (5), comparativamente com os marcadores β -sitosterol e estigmasterol (6 e 7).

No *screening* fitoquímico da raiz de *A. hispidum* foram detectados mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteróides, açúcares redutores, flavonóides, fenilpropanóides e derivados cinâmicos (cf. Quadro 4.3, página 57). Além destes, foram detectados ainda o timol, derivados de verbascosídeos e do ácido clorogênico.

6.2.2. Doseamento de esteróides totais

O doseamento de esteróides totais a partir do kit comercial de doseamento do colesterol COD-PAP, no plasma foi pensado como uma possibilidade de método quantitativo para o controle de qualidade, tanto da matéria-prima, como do produto acabado. Este doseamento se baseia na determinação dos ésteres de colesterol, que são hidrolisados pela enzima colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio, que sob a ação da peroxidase, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 500 nm.

É sabido que algumas plantas apresentam quantidades significativas de esteróides. Duas espécies, *Maytenus rigida* e *Aspidospema pyrifolium*, foram escolhidas para o estudo, por já se saber de antemão que a primeira tem quantidades de esteróides bem marcantes e a segunda, um pouco menos. Dessa forma as duas foram usadas neste estudo, comparativamente com *A. hispidum*, onde aparentemente os esteróides se encontram ainda em menor concentração. Este dado foi confirmado tanto na presente leitura quanto qualitativamente, por CCD (Tabela. 6.2).

Tabela 6.2 Resultados das leituras de doseamento de esteróides totais em *Acanthospermum hispidum* comparativamente com *Aspidospermum pyriformium* e *Maytenus rigida*

Espécies vegetais	Parte da planta	500 nm	mg/dL
<i>A. hispidum</i>	raízes	0,014	6,08
<i>A. pyriformium</i>	folhas	0,032	13,91
<i>M. rigida</i>	folhas	0,220	95,62
Colesterol	-	0,460	-

De posse dos resultados anteriores foram realizadas as leituras do xarope acabado recém produzido e após 30 dias. Neste caso, observou-se uma redução dos esteróides totais, conforme dados da Tabela 6.3. Vale ressaltar que este método foi criado para uso em plasma ou soro, necessitando, portanto de validação.

Tabela 6.3. Dosagens de esteróides totais nos xaropes

Tempo	500 nm	Mg/dL
1º dia	0,012	5,21
30º dia	0,010	4,34

6.3. DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA XAROPE

Baseado nos diferentes xaropes de *Acanthospermum hispidum* encontrados no mercado, que apresentam composições das mais diversas, associando esta, a outras plantas como, o alho, a alfavaca, a hortelã, além de própolis e mel, foi realizada uma preparação exclusivamente com o extrato da espécie de interesse, no laboratório, para servir como padrão de comparação entre todas as outras fórmulas já citadas, além da realização do estudo da estabilidade.

6.4. ESTABILIDADE

Para realização do estudo de estabilidade, são avaliadas as características organolépticas, características macroscópicas, pH, viscosidade e doseamento de esteróides como colesterol. No momento, as preparações estão sendo submetidas à estabilidade de prateleira, e estudo de estabilidade acelerada.

Em conclusão, é evidente a necessidade de dar continuidade a este trabalho, com o objetivo de contribuir para o controle de qualidade destes fitoterápicos, expostos ao uso comercial por décadas sem os devidos cuidados.

6.6. PROPOSTA DE RÓTULO



Laboratório de Fitoterapia de Olinda

PE 15, KM 3, Cidade Tabajara, Olinda/PE tel.: (81) 3429 1121

CGC 000 000 000 0001-54

Farmacêutico Responsável: Dr. Cláudio Galeno CRF 000001

Karope Antiasmático de Espinho-de-cigano

Expectorante e broncodilatador, nos processos respiratórios alérgicos e produtivos

Composição:

Cada colher-medida (10 mL) contém:

Acanthospermum hispidum (20%) 1,36 mL

Allium sativum 0,12 g

Cyammomum zeylanicum 4 g

Karope simples q.s.p.....10 mL

Fab.: 31/10/2007

Vál.: por X meses

Posologia:

Nas crises: Crianças: >2 anos (1/2 colher-medida) e adultos (1 colher-medida) de 6/6 horas.

Preventivo: 1 colher (conforme a idade) ao deitar durante dois meses

ATENÇÃO: Este é um produto ainda sob pesquisa. Guardar em local ventilado, ao abrigo da luz, dentro da embalagem original e longe do alcance de crianças. Para maiores esclarecimentos VIDE BULA.

6.7. PROPOSTA DE BULA PARA O MEDICAMENTO⁵

XAROPE DE ESPINHO-DE-CIGANO

Identificação do Medicamento:

Nome comercial:
Xarope de Espinho-de-Cigano

Composição:

Cada medida (10 mL) contém:

Tintura de <i>Acanthospermum hispidum</i> (20%)	1,36 mL
<i>Allium sativum</i>	0,12 g
<i>Cynammomum zeylanicum</i>	4 g
Xarope simples q.s.p.....	10 mL

Forma Farmacêutica & Apresentação

Xarope de Espinho-de-Cigano (*Acanthospermum hispidum*). Embalagens em vidro âmbar com 200 mL para uso oral. Acompanha uma colher-medida (10 mL).

Uso Pediátrico & Adulto

Informações ao Paciente:

O **Espinho-de-cigano** tem suas raízes empregadas popularmente no tratamento de "cansaço" na região nordeste do Brasil. Desde o final dos anos 80 vem sendo utilizada nos Serviços de Saúde Pública de várias Prefeituras, e, mais recentemente, comercializado. Apesar de não se ter esclarecido ainda seu mecanismo de ação, algumas pesquisas já sugerem segurança e apontam para algumas ações que confirmam o uso popular. Assim, observou-se uma atividade anti-histamínica, que seria compatível com seu uso em casos de asma alérgica, além de relaxamento de vasos (hipotensão) que poderia ser semelhante a uma possível ação nos brônquios. Mostrou ainda boa atividade antimicrobiana. Na aplicação deste xarope tem-se observado uma resposta melhor com o uso contínuo, preventivo. Este fato se traduz em vantagem em relação a outros medicamentos de uso contínuo, que em geral são acompanhados de efeitos colaterais.

Indicações: O **Xarope de Espinho-de-Cigano** está indicado nos processos de rinites e asma alérgicas, bronquites alérgicas agudas ou crônicas.

Contra-indicações:

- Por absoluta falta de estudos em humanos, este produto está totalmente contra-indicado em gestantes, em qualquer período da gravidez.
- A utilização de açúcar e álcool na formulação torna este produto contra-indicado para uso por pessoas portadoras de diabetes, disfunção hepática (cirrose, hepatite, alcoolismo) ou renal.

⁵ Resolução-RDC nº 140, de 29 de maio de 2003.

- Precauções:**
- Mesmo em pequena quantidade, a utilização de tintura hidroalcoólica na preparação **Xarope de Acanthospermum** o torna contra-indicado para crianças abaixo dos dois anos de idade.

Interações medicamentosas: Embora seja utilizado na prática há quase duas décadas, não existe até o momento estudos dando conta de interações com outros medicamentos.

Efeitos Indesejados: Até o momento não existe registro de casos de efeitos colaterais ou indesejados, nem reações adversas com o uso deste medicamento.

Características: O **Xarope de Espinho-de-Cigano** apresenta-se de aspecto um pouco turvo, com coloração amarelo-escura. Tem cheiro e sabor predominante de canela. Presença de espuma e cheiro ou sabor ácido denotam contaminação por agentes microbianos devendo ser desprezado.

Modo de usar & Posologia:

Crianças de 3 - 7 anos: Nas crises usar uma colher-medida, via oral, 3 a 4 vezes ao dia. Como preventivo, um colher-medida toda noite, durante dois meses.

Crianças maiores e adultos: Usar o mesmo esquema de tratamento aumentando a dose para uma colher-das-de-sopa.

- Informe ao seu médico o aparecimento de reações indesejáveis;
- Informe ao seu médico se você está fazendo uso de algum outro medicamento
- Não use medicamento sem o conhecimento do seu médico. Pode ser perigoso para a sua saúde
- Siga a orientação de seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento;
- Siga corretamente o modo de usar. Não desaparecendo os sintomas, procure orientação médica;
- Não use o medicamento com o prazo de validade vencido. Antes de usar observe o aspecto do medicamento, e

Cuidados: Atenção:

- Este é um medicamento novo e, embora as pesquisas tenham indicado segurança aceitável para comercialização, efeitos indesejáveis e não conhecidos podem ocorrer. Neste caso, informe seu médico.
- Em caso de superdosagens ficar alerta para os sintomas, pela presença de álcool na formulação.
- O medicamento deve ser guardado em local fresco, ao abrigo da luz, em sua embalagem original.
- Manter fora do alcance das crianças;

Dizeres legais:

Número do registro na ANVISA/MS;

Farmacêutico responsável:

Inscrição no CRF:

Nome completo e endereço do fabricante e do titular do registro.

Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica, CNPJ.

Telefone do Serviço da Empresa de Atendimento ao Consumidor.

CAPÍTULO VII

SECÇÃO EXPERIMENTAL

7. SECÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo encontram-se detalhadas todas as metodologias utilizadas em cada abordagem disciplinar.

7.1. METODOLOGIAS DO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO

7.1.1. Farmacobotânica

7.1.1.1. Anatomia & Histologia

Exemplares dessecados de *A. hispidum* foram levados ao IPA para identificação desde as primeiras tentativas de cultivo em Olinda, em 1997 (cf. Anexo III). No presente trabalho *A. hispidum* foi coletado nos jardins de cultivo do Laboratório de Farmacognosia da UFPE, em Recife, e os de *A. australe* em Camaragibe, região metropolitana do Recife, estando um exemplar de cada espécie depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima (IPA - 73350 e 73437, respectivamente.).

Folhas completamente expandidas, sem qualquer dano visível, foram removidas de cada indivíduo e fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético, etanol, água, 5:5:45:45). Lâminas semipermanentes foram confeccionadas e as secções transversais e paradérmicas foram coradas com safranina e azul de astra (JOHANSEN, 1940).

As descrições anatômicas foram baseadas em Metcalf & Chalk (1972 e 1988) e a classificação dos estômatos seguiu Baranova (1987). As observações e as análises foram feitas em imagens digitais, com o programa de análise Image Tool (WILCOX *et al.*, 2002). As barras foram determinadas a partir de imagens de uma lâmina micrometrada, nas mesmas condições das imagens das secções originais da planta.

7.1.1.2. Histoquímica

Secções transversais da raiz, caule e região mediana da lâmina foliar foram utilizadas para as análises histoquímicas. Alcalóides foram testados com reagente de Wagner (FURR & MAHLBERG, 1981), amido com lugol (JOHANSEN, 1940), compostos fenólicos gerais com cloreto férrico (JOHANSEN, 1940), lignina com floroglucina ácida (KRAUS & ARDUIM, 1997) e lipídeos, cutina e suberina com Sudan III (SASS, 1951) e proantocianidinas (taninos) com vanilina clorídrica (RICCO *et al.*, 2002).

A cor produzida na lâmina foi fotografada em diferentes aumentos, usando câmera digital (Sony W5) e microscópio óptico (Olympus).

7.1.1.3. Análise do pó da Droga

Lâminas semipermanentes foram confeccionadas de fragmentos de raiz, com aproximadamente 1 cm de comprimento, imersos em uma mistura de ácido crômico e ácido nítrico, na proporção de 1:1. Os fragmentos foram mantidos nesta solução por um período de 24 horas sendo a solução foi trocada toda vez que se tornava escura. As amostras foram lavadas em água destilada, sucessivas vezes, e lavadas em solução de álcool a 50%, depois coradas com safranina alcoólica a 1% em etanol a 50% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas três vezes em etanol a 30% para a retirada do excesso do corante. O material foi montado em glicerina aquosa a 60% (KRAUS & ARDUIM, 1997).

Uma amostra dos tipos celulares foi utilizada para realizar medições do comprimento e largura dos principais elementos celulares, como vasos de xilema, fibras e células de parênquima de, pelo menos, três indivíduos.

Observações e análises foram feitas em imagens digitais e programa de análise Image Tool (WILCOX *et al.*, 2002). As barras foram determinadas a partir de imagens de uma lamina micrometrada, nas mesmas condições das imagens dos cortes da planta.

7.1.2. Farmacoquímica

7.1.2.1. Testes de pureza

Nos testes de pureza, as determinações da perda por dessecação, do teor de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido, foram realizadas segundo a Farmacopéia Brasileira IV (2000).

A Determinação da perda por dessecação foi feita em três amostras de 3 g de droga vegetal em pesa-filtro, previamente tarado, as quais foram colocadas em estufa a 105° C, por 2 horas, resfriadas em dessecador por 30 min., repetindo-se o processo até peso constante.

Para a determinação do **Teor de cinzas totais**, três amostras de 3 g da droga vegetal foram acondicionadas em cadinhos de porcelana, previamente pesados e carbonizadas em mufla a 400° C, por 4- 5 horas; resfriadas em dessecador e repesadas até obtenção de valor constante. Calculou-se o teor de cinzas totais pela diferença entre o peso do conjunto cadinho e amostra, antes e após a incineração.

A determinação das **Cinzas insolúveis em ácido** foi realizada em 25 mL de ácido clorídrico a 10%, em cadinho contendo resíduos das cinzas totais, fervidos por 5 min, filtrado duas vezes em papel de filtro com tarja preta. Após lavagem do papel de filtro, com água fervente até obter pH neutro, acondicionou-se o papel de filtro em um segundo cadinho, tarado e pesado. Carbonizou-se a 100°C na mufla por 4-5 horas, até peso constante, resfriou-se no dessecador e pesou-se o cadinho.

7.1.2.2. Prospecção (Perfil fitoquímico dos extratos brutos de raiz, caule e folha)

Para a prospecção fitoquímica, foram preparadas infusões metanólicas de 20 mL, contendo amostras com 1 g de raízes, caules e folhas; alíquotas de 10 µL foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD), para análise da presença de grupos de metabólitos secundários, empregando-se diversas fases móveis e reveladores específicos (HARBONE, 1998; WAGNER & BLADT, 1996; XAVIER *et al.*, 2002; SENNA FILHO *et al.*, 2006).

Esta prospecção foi realizada utilizando-se placas de sílica gel 60 F254 (Merck, Alemanha, Art.105554 e Macherey-Nagel Art. 818.133). Como fases móveis, foram usadas na investigação de substâncias polares, a mistura descrita por Wagner, 1996, constituída por Acetato de etila/Ácido fórmico/Ácido acético/Água [100:11:11:26], para aquelas de polaridade mediana, uma variante desta fase móvel, diminuindo-se as porções dos ácidos e de água, definidos para 5 e 2 partes, respectivamente. Para os componentes de polaridade mais baixas, tais como terpenóides e polifenóis simples, foram empregados a mistura Tolueno/Acetato de etila [97:3 ou 90:12]. Para cromatografia de oses e polióis, a mistura *n*-Butanol/Acetona/Tampão fosfato, pH 5,0 [40:50:10] (RUSSEL, 1983). A caracterização dos grupos de metabólitos presentes nos cromatogramas foi efetuada empregando-se diversos reativos cromogênicos (cf. Quadro 7.1). Os testes de afrogenicidade, para saponosídeos, foram desenvolvidos em tubos de ensaio.

Quadro 7.1: Metabólitos, fases móveis e reagentes de caracterização.

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Dragendorff	WAGNER, 1996
Monoterpenóides e Sesquiterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:3)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Diterpenóides	Benzeno-AcOEt (93:7)	Vanilina sulfúrica	WAGNER, 1996
Triterpenóides e Esteróides	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:0,5:0,5:0,5)	Lieberman/Burchard	HARBONE, 1998
Iridóides	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Vanilina sulfúrica	SÁ BARRETO, 2005
Saponinas	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Anisaldeido	WAGNER, 1996
Açúcares	<i>n</i> -BuOH-Me ₂ CO- TPPO ₄ (40:50:10)	Cloreto de Trifeniltetrazólio	METZ, 1961
Glicosídeos Cardíacos	AcOEt-MeOH-H ₂ O (100:13,5:10)	Kedde	WAGNER, 1996
Polifenóis:			
Cumarinas	Et ₂ O-Tolueno-AcOH 10% (50:50:50)	U. V.	WAGNER, 1996
Derivados cinâmicos	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Difenilboriloxietilamina	XAVIER, 1988
Flavonóides	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Difenilboriloxietilamina	XAVIER, 1988
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt-AF-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27)	Vanilina clorídrica	ROBERTSON, 1955
Taninos hidrolizáveis	<i>n</i> -BuOH-Me ₂ CO- TPPO ₄ (40:50:10)	Difenilboriloxietilamina Alumem de ferro	XAVIER, 2002 STIASNY,1912

Para a investigação dos polifenóis presentes nas raízes, procedeu-se a uma hidrólise ácida do extrato bruto metanólico (EBM), empregando-se HCl 2N, mantendo-se sob refluxo durante 3 horas (MAHKHAM, 1981). Uma análise do hidrolisado, após eliminação da acidez por tratamento com Duolite S-861 mostrou em CCD (celulose Merck, Alemanha, Art. 105554), empregando-se como fase móvel Acetato de Etila/Clorofórmio/Metanol/ Acetona/Água (20:20:2:1:0,5), a presença majoritária de ácido caféico.

7.1.2.3. Extração, Isolamento & Identificação de constituintes presentes do extrato hexânico

Raízes secas e pulverizadas (620 g) foram submetidas a uma extração a frio, com metanol, sob agitação esporádica durante 48 horas. O extrato resultante foi submetido à evaporação a vácuo, fornecendo 15 g de extrato bruto metanólico (EBM). Este foi cromatografado em coluna, utilizando-se 120 g de sílica gel (Merck, Germany 70-230 mesh). Procedeu-se a eluição, inicialmente com *n*-hexano, prosseguindo-se, em ordem crescente de polaridade, com acetato de etila (2%, 5%, 10% e 100%), seguido de acetato de etila/metanol (2% e 5%). O volume aproximado de cada fração foi de 50 mL, obtendo-se desta forma um total de 150 frações, sendo monitoradas por CCD.

As frações de 34 a 36 foram juntas e após eliminação do solvente a vácuo, forneceu 730 mg de um sólido branco (**EA-1**), o qual foi submetido à recristalização em hexano, resultando na obtenção de material cromatograficamente puro. As frações de 58 a 72 (180 mg), foram reunidas e após eliminação do solvente, recromatografadas em sílica gel com *n*-hexano, aumentando-se gradativamente a polaridade com tolueno (2%, 5%, 10% e 100%). No total foram obtidas 89 frações. As frações de 14 a 19 foram reunidas mostrando, após a evaporação do solvente, um sólido branco, ainda contendo impurezas, quando submetido à CCD, portanto, como na outra fração, recromatografada, resultando em 156,2 mg de um sólido branco amorfo (**EA-2**).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e experimentos em 2D (COSY, HMQC e HMBC), em CDCl_3 , foram registrados em espectrômetros Bruker DRX-500 (^1H 500MHz e ^{13}C 125 MHz). Os deslocamentos químicos foram registrados tendo o TMS como padrão interno.

7.1.3. Estudo Farmacoergástico

7.1.3.1. Sazonalidade

No presente ensaio, canteiros foram semeados mensalmente, durante um ano, e as plantas com 90 dias de germinadas, colhidas também mensalmente, tendo os extratos brutos metanólicos analisados em CCD.

7.1.3.2. Variação geográfica

Realização de estudos fitoquímicos em amostras de *A. hispidum* recolhidas das três regiões geográficas do Estado: Zona da Mata, Agreste e Sertão.

7.1.3.3. Desenvolvimento do Cultivo

O cultivo foi desenvolvido em canteiros adubados com 3 kg de composto urbano por m², acrescido de 100g/m² da formulação NPK (40-20-40). A dificuldade inicial de germinação foi contornada com irrigação contínua, seguida do transplante das plântulas germinadas após 2 -3 semanas.

7.2. METODOLOGIAS DO ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM HISPIDUM* PELO MÉTODO DPPH - MÉTODO DO RADICAL LIVRE DPPH• (1,1,-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL)

Uma solução estoque de DPPH em metanol, na concentração de 0,4 mM foi preparada. A partir desta, foram feitas diluições de 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 e 0.0125 mM. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções.

Alíquotas (0,6 mL) das soluções metanólicas de *Acanthospermum hispidum*, com concentrações totais de 25, 50 e 100 µg/mL, foram colocadas em diferentes tubos de ensaio. Em seguida, 5,4 mL da solução de DPPH em metanol (0,05 mM) foram adicionados e, após agitação, os tubos foram deixados em repouso, ao abrigo da luz. Ao final de 15, 30, 45 e 60 min, a absorbância foi medida a 517 nm e a capacidade de seqüestrar o radical, expressa como percentual de inibição, calculada de acordo com a seguinte equação matemática:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs controle = absorbância do controle (solução de DPPH sem antioxidante)

Abs amostra = absorbância da amostra a ser testada

O mesmo procedimento foi realizado empregando-se soluções metanólicas de padrão rotina, nas concentrações de 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg/mL, para a construção de uma curva padrão (MELO *et al.*, 2006).

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão (DP). O teste *t* foi utilizado para comparação entre duas médias e a análise de variância ANOVA utilizada para comparação de mais de duas médias. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

7.2.2. Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Metanólico de *Acanthospermum hispidum*

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em disco de papel em meio sólido (BAUER *et al*, 1966), onde foram utilizados para o teste dez tipos de microrganismos, representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* - UFPEDA 01; *Bacillus subtilis* - UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* - UFPEDA 138; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* - UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* - UFPEDA 39; *Serratia marcescens* - UFPEDA 398; um bacilo álcool-ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* W - UFPEDA 71; fungo filamentoso *Monilia sitophila* UFPEDA 2083; e levedura *Candida albicans* UFPEDA 1007. Os microrganismos fazem parte da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As suspensões foram preparadas em solução salina 0,89%, a partir de culturas recentes e padronizadas a uma densidade óptica de 0,2 de absorvância a 600nm, equivalente à turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland (BARRY, 1986; KONEMAN, 1997), correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Placas de Petri contendo meios de cultivo sólidos, Mueller-Hinton ágar (para *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *S. marcescens*), meio glicose-extrato de levedura-GL (para *E. faecalis* e *M. smegmatis*) e Sabouraud (para *C. albicans* e *M. sitophila*), foram semeadas

com 0,01 mL da suspensão do microrganismo teste. Sobre o meio inoculado, foram colocados em discos de papel, de 6 mm de diâmetro, saturados com 20 µL e 10 µL da solução 30.000 µg/mL e 200.000 µg/mL, correspondente a 600 µg e 2.000 µg do extrato bruto, respectivamente. Os discos foram colocados na superfície do meio sólido, previamente semeado e as placas mantidas em geladeira (12°C) por 30 minutos, para difusão do princípio ativo no meio, antes de iniciado o crescimento dos microrganismos (CHIAPPETA *et al*, 1999). Após o período de difusão foram incubadas, durante 24 e 48h, à temperatura de 30 e 37°C.

Os antibióticos Kanamicina e Cetoconazol foram utilizados no testes como antibióticos padrões, nas concentrações de 30 µg/disco e 300 µg/disco, respectivamente.

Para a kanamicina, halos maiores ou iguais a 18 mm foram considerados indicativos de sensibilidade, halos variando de 14 a 17 mm indicativos de sensibilidade moderada e halos menores ou iguais a 13 mm, indicativos de resistência do microrganismo teste (BAUER *et. al*, 1966).

Para o cetoconazol, utilizado nos testes como padrão, halos maiores que 15 mm foram considerados indicativos de alta sensibilidade, halos entre 10 e 15 mm indicativos de sensibilidade moderada e halos inferiores a 10 mm indicativos de resistência do microrganismo teste (BIER, 1978).

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão e avaliadas empregando-se análise de variância de um fator (ANOVA), tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância estatística. Halos iguais e superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antibiótica dos extratos, com base nas recentes publicações, onde halos de 8 mm são referidos como representativos para extratos brutos de origem vegetal (AWADH *et al*, 2001; BAKSHU *et al*, 2001; CHOWDHURY *et al*, 2002; KHAN *et al*, 2001).

7.2.3. Determinação de Concentração Mínima Inibitória (CMI) do Extrato Bruto Metanólico de *Acanthospermum hispidum*

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada para os extratos que exibiram melhor atividade contra os microrganismos testes, sendo valores iguais ou superiores a 1000µg/mL considerados não significativos (HOLETZ *et al.*, 2002). De cada extrato a ser testado, foram preparadas soluções 20.000 µg/mL em DMSO. Alíquotas de volumes variados dessas soluções foram colocados em placas de Petri e incorporadas a 10 mL do meio de cultura por homogeneização, obtendo assim, diferentes concentrações das substâncias na placa (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL). As placas contendo as substâncias, bem como as placas controle (contendo apenas o meio de cultura), foram semeadas em estrias com as suspensões padronizadas dos microrganismos testes e incubadas à 37°C por 24 horas.

Kanamicina e Cetoconazol foram utilizados no testes como padrões, nas concentrações de 30 µg/disco e 300 µg/disco, respectivamente. Para a primeira, halos maiores ou iguais a 18 mm foram considerados indicativos de sensibilidade, halos variando de 14 a 17 mm indicativos de sensibilidade moderada e halos menores ou iguais a 13 mm, indicativos de resistência do microrganismo teste (BAUER *et al.*, 1966). Para o cetoconazol, halos maiores que 15 mm foram considerados indicativos de alta sensibilidade, halos entre 10 e 15 mm indicativos de sensibilidade moderada e halos inferiores a 10 mm indicativos de resistência do microrganismo teste (BIER, 1978).

7.2.4. Avaliação da Atividade Citotóxica do Extrato Bruto Metanólico de *Acanthospermum hispidum*

As células NCI-H292 (obtidas de carcinoma mucoepitelial de pulmão humano), HEP-2 (derivadas de carcinoma epidermoide de laringe humana) e VERO (linhagem de células não cancerígenas, de epitélio de rins de macaco) foram mantidas em DMEM - Minimm Essencial Médium Eagle modificado Dulbecco's (SIGMA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA), 1% de solução de antibióticos (penicilina 1000 ui/mL + esteptomicina 250 mg/mL) e 1% L-glutamina 200 mM. Os testes foram feitos em 5 repetições, frente a três linhagens celulares, usando a vincristina como padrão.

Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o corante de Azul Tripán (MERCK) 0,4% em PBS (tampão fosfato), o qual penetra facilmente nas células danificadas corando-as de azul, enquanto que as células íntegras permanecem incolores, permitindo assim, determinar a porcentagem de células vivas e células mortas (WEISENTHAL *et al.*, 1983).

A contagem das células foi realizada em microscópio invertido Leitz, com a utilização de um hemocitômetro, preenchendo com uma alíquota da suspensão de células homogeneizadas.

Para determinação da citotoxicidade, a suspensão celular de 10^5 células/mL foi preparada em meio adaptado, para cada linhagem celular. A suspensão foi distribuída em placas de cultura, com 96 poços (225 μ L em cada poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Sedas, Milão/Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24 h, as substâncias teste foram adicionadas (25 μ L/poço) e as placas reincubadas a 37°C (COSTA & NASCIMENTO, 2003).

O método do MTT (MOSMANN, 1983) baseia-se na capacidade que as células vivas possuem de reduzir o sal tetrazólio de cor amarela, a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita graças à ação da

enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas em células vivas (HESS & PEARSE, 1963).

Após 72 h de contato das células com o produto teste, foi adicionado a cada poço 25µL de MTT brometo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), a uma concentração de 5 mg/mL em PBS. As placas foram então deixadas, por duas horas, em estufa (37°C). Ao final desse período, os meios de cultura, juntamente com o excesso de MTT foram aspirados e em seguida 10 µL de DMSO foi adicionado a cada poço, para dissolução dos cristais Formazan (ALLEY *et al.* 1988).

Para verificar a porcentagem de inibição, a leitura óptica foi feita em leitor automático de placas, do tipo Multiskan a 540 nm. A densidade óptica (DO) média dos poços testes foi comparada com a média dos poços controle. O produto padrão utilizado nos testes foi a vincristina (CI₅₀ frente às células NCI-H292 = 0,0438 µg/mL)

A CI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) é determinada a partir de uma regressão linear, onde se relaciona o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p \leq 0,01$), para a reta obtida (NASCIMENTO, 1993). Extratos brutos com valores de CI₅₀ $\leq 30\mu\text{g/mL}$ podem ser considerados como possuindo atividade citotóxica e, para o padrão (vincristina), valores de CI₅₀ $\leq 4\mu\text{g/mL}$ devem ser considerados significativos. Em ambos os casos, são utilizados como base o protocolo do Instituto Nacional do Câncer -USA (GERAN *et al.*, 1972) (Cf. Anexo I).

7.2.5. Atividade Antiinflamatória Pulmonar do Extrato Bruto Metanólico de *Acanthospermum hispidum*

Este protocolo experimental consiste em avaliar a resposta inflamatória de células totais de defesa e de neutrófilos, em particular, após exposição à injeção de LPS (lipopolissacáride de *Escherichia coli*), em animais tratados com a dexametasona, com o extrato bruto da planta (EBM), comparativamente com um grupo controle, usando solução salina.

LPS são substâncias bacterianas pró-inflamatórias, capazes de induzir obstrução brônquica em pacientes asmáticos, com aumento local de histamina e de marcadores inflamatórios no sangue (MICHEL, 1995).

7.2.5.1. Animais

Foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, com 90 - 150 dias de vida, provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais são mantidos com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12/12h (com luzes acesas às 6h). Tendo livre acesso à água potável e filtrada e à ração comercial (LABINA - Purina, Agribbrands do Brasil Ltda), utilizada como padrão nos biotérios.

O protocolo de pesquisa (nº. 009826/2007-31) foi encaminhado para a Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco e devidamente aprovado (Anexo II).

7.2.5.2. Administração do LPS

Os três grupos de animais (n=6/grupo) receberam injeção intraperitoneal de LPS (lipopolissacarídeo do sorotipo de *Escherichia coli*; 055:B5, SIGMA) na dose de 1mg/kg de peso corporal (PC), preparado em NaCl a 0,9%, alguns minutos antes de ser injetado. O grupo controle recebeu pela mesma via, a mesma proporção de solução salina, enquanto ao grupo teste, foi aplicado o extrato da planta (EBM), na dose de 250 mg/kg de peso, v.o. O terceiro grupo, também via oral, 3 mg/kg de peso de dexametasona. Após 24 horas, os animais foram anestesiados com cloralose-urteana (0,5 e 12,5% respectivamente), via i.p., na proporção de 10 mL/Kg de peso corporal, para traqueostomia e lavagem broncoalveolar.

7.2.5.3. Lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi obtido dos animais sob efeito do anestésico. Cada animal foi colocado um a um, em superfície plana de parafina, em decúbito dorsal, com as patas presas por agulhas, para realização do procedimento cirúrgico de traqueostomia. Inicialmente, realizou-se uma assepsia com álcool etílico a 70%, cortando-se em seguida, os pêlos e a pele na porção média do pescoço, abrindo-se e afastando-se as camadas musculares até se obter acesso à traquéia. Com uma pequena pinça, isola-se a traquéia e, com uma tesoura, faz-se um pequeno orifício entre dois anéis traqueais, na porção ventral da mesma. Insere-se então uma cânula plástica, acoplada a uma seringa, contendo 3 mL de solução de NaCl a 0,9% (soro fisiológico-SF), à temperatura ambiente (cf Fig. 7.1). Várias alíquotas de SF são injetadas e imediatamente coletadas. O LBA recolhido é depositado em tubo de centrífuga tipo Falcon de 50 mL. O procedimento de coleta do material foi realizado até que se obtenha

cerca de 30 mL do LBA, para cada rato. Ficando o LBA armazenado em banho de gelo e ao abrigo da luz, até que se inicie a próxima etapa.



Figura 7.1.: Preparação cirúrgica para realização do lavado broncoalveolar: **a)** traqueostomia e **b)** canulação.

7.2.5.4. Contagem total das células do LBA

As células foram contadas ao microscópio de luz (utilizando a objetiva de 40x), a partir de uma amostra do LBA na diluição de 1:10, em solução de NaCl a 0,9%. Utilizou-se uma câmara de volume conhecido (hemocitômetro ou Câmara de Neubauer). O resultado foi obtido aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Células/mm}^3 \text{ de sangue} = n \times 10 \times 10 \times 10^3.$$

Onde: n = número total de células contados nos 4 campos

7.2.5.5. Contagem diferencial das células do LBA

Para contagem diferencial das células do LBA foram confeccionadas lâminas, a partir de preparações citocentrifugadas do LBA de cada animal. Inicialmente, na diluição de 1:10 do LBA em SF. Em seguida, 200 µL da diluição do LBA foram centrifugados (Citocentrífuga Cytopro™-Cytocentrifuge Wescor), diretamente em lâminas histológicas, a 800rpm/10min, em alta velocidade. As preparações foram então fixadas e coradas, com o Kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda). As lâminas depois de secas a temperatura ambiente, são lidas ao microscópio de luz, com a objetiva de imersão (100x), pela contagem de 200 células. As diferentes células são quantificadas em um contador eletrônico da marca Kacil, com teclas correspondentes a cada tipo de célula do LBA. A partir dos dados obtidos, foi calculado o número absoluto de cada tipo de célula do LBA, como se segue:

$$\text{N.º absoluto da célula} = \frac{\% \text{ da célula} \times \text{contagem celular total}}{100}$$

Para comparação entre os grupos, empregou-se o teste t de Student, para os dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney U. A significância estatística será considerada admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos.

7.3. METODOLOGIA FARMACOTÉCNICA

7.3.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PRODUTOS DO MERCADO

7.3.1.1. Propriedades Organolépticas

Quatro amostras de produtos manipulados com *A. hispidum*, adquiridos no comércio de Recife e uma preparada no Laboratório de Olinda, foram entregues a quatro profissionais do Laboratório de Farmacognosia, isoladamente, aos quais foram solicitados avaliação de odor e sabor, sendo observados ainda os aspectos de limpidez e coloração.

7.3.1.2. Testes Físico-químicos

Para a análise de **Viscosidade**, foi utilizado viscosímetro da marca Brookfield, modelo DVI+ vicometer, utilizando spindle nº 2, velocidade de rotação de 100 RPM. O resultado da viscosidade foi expresso em unidade de cP (centi Poise).

Para **Determinação de pH**, utilizou-se potenciômetro marca Micronal, modelo B 474, com eletrodo de vidro combinado com solução interna de cloreto de potássio (KCl), saturada com cloreto de prata (AgCl). O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Foi realizada uma análise de pH direta, sem diluição da amostra.

Para a **Determinação da densidade**, relativa foi utilizado picnômetro de vidro, devidamente calibrado. A densidade foi calculada a partir da seguinte equação:

$$d_{\text{xarope, \acute{a}gua}} = \frac{m_{\text{xarope}}}{m_{\text{\acute{a}gua}}}$$

Onde:

m_{xarope} é a massa do xarope que ocupa o volume V do picnômetro;

$m_{\text{\acute{a}gua}}$ é a massa de água pura que ocupa o mesmo volume V.

O resultado da densidade relativa foi expresso em g/cm³

7.3.1.3. Controle de Qualidade do Xarope

Dois métodos foram realizados para comparação entre os xaropes:

Primeiramente procedeu-se a eliminação do açúcar das formas comerciais. Foram utilizadas amostras (15 mL), aquecidas em placas de Petri em chapa elétrica até obtenção do resíduo. Este foi então dissolvido em água destilada e submetido a uma coluna cromatográfica de fase reversa empregando-se Duolite S-861 como fase estacionária e água como fase móvel. Após eliminação do açúcar presente desadsorvendo-se as substâncias por eluição, com metanol. Este método foi realizado para comparação e entre polifenóis.

Em seguida foram utilizados marcadores esteroidais para o estudo comparativo, entre as amostras comerciais de xarope.

Para purificação dos xaropes procedeu-se uma percolação em acetato de etilade utilizando 5 mL de xarope incorporado a 20 g de sílica para coluna. O filtrado foi cromatografado em CCD de sílica, artigo coluna 60 (70-230 mesh, Merck, Germany), no sistema tolueno/acetato de etila (90:12), revelado com Liebermann-Burchard.

7.3.2. FORMA FARMACÊUTICA XAROPE

Para realizar uma preparação exclusivamente com o extrato da raiz de *A. hispidum* foi utilizada a metodologia de dissolução a quente da droga em pó, partindo da fórmula de xarope simples citada abaixo, e incorporando-se em seguida 13% do extrato da raiz.

Sacarose	65%
Nipagin	0,15%
Nipazol	0,05%
Água destilada q.s.p.....	100%

7.3.3 DOSEAMENTO DE ESTERÓIDES TOTAIS

Foram utilizados Kit de Doseamento de colesterol total, da marca KATAL, constando de reagente enzimático, constituído de solução aquosa contendo tampão pH 6,90, 4- aminoantipirina 0,5 mmol/L Fenol 10 nmol/L, colesterol esterase > 400/L, colesterol oxidase > 300/L, peroxidase > 1000 U/L e azida sódica 0,1g/dL e padrão de colesterol 200 mg/dL (5,2 mmol/L) e solução azida sódica 0,1 g/dL.

A dosagem foi realizada em triplicata, cada amostra (0,05 mL) foi homogeneizada com o reagente enzimático (5,0 mL) e colocada em banho-maria a 37 °C, durante 10 minutos. O padrão utilizado foi o colesterol e como branco (5 mL) o reagente enzimático do kit. A absorbância foi lida em 500 nm e os cálculos determinados segundo o manual do Kit (2006).

7.3.3.1. Preparo das Amostras

Foram preparadas três amostras: raízes de *A. hispidum*, folhas de *Maytenus rigida* e folhas de *Aspidorpermum piryfolium*, todas em solução hidroalcoólica a 20%.

Para realização do estudo de estabilidade, as preparações foram submetidas à estabilidade de prateleira, e estudo de estabilidade acelerada, e se encontra em andamento. Para tanto, são avaliadas as características organolépticas, características macroscópicas, pH, viscosidade e doseamento de esteróides, como colesterol.

CAPÍTULO VIII
CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

A partir da década de 80, tem sido cada vez maior o número dos chamados “produtos naturais” encontrados no comércio de medicamentos formais ou informais, os quais são oferecidos à população com indicações às vezes as mais contraditórias. O distanciamento criado entre a expansão do mercado de fitoterápicos e a legislação pertinente tem dado margem a uma interminável batalha, entre os fabricantes destes produtos e a Vigilância Sanitária, ficando mais uma vez as pessoas vulneráveis, à falta dos medicamentos ou, o que talvez seja mais grave, aos riscos do consumo de produtos de má qualidade.

De uma maneira geral, os resultados obtidos de publicações com a raiz de *A. hispidum*, sejam fitoquímicos ou ensaios biológicos, excetuando-se os estudos de RAMANCHADRAN *et al.* (1976 e 1985), foram realizados na UFPE, demonstrando o pouco interesse em relação àquela parte do vegetal em outros países, e, mesmo no Brasil. As publicações referentes à Farmacobotânica demonstram que os órgãos vegetativos de algumas espécies da família Asteraceae apresentam grande número de caracteres comuns. Entretanto, o presente estudo identificou caracteres anatômicos únicos para a espécie *Acanthospermum hispidum* que, associados à análise histoquímica, se revelaram capazes de garantir a identificação botânica segura para a espécie em questão, e inéditos.

Assim, estes estudos podem ser empregados como parâmetros para o controle de qualidade da raiz de *Acanthospermum hispidum* como matéria-prima, observando-se a presença dos três tipos de células de xilema: tipo 1) vasos com ambas as paredes terminais retas de comprimento variado; tipo 2) vasos com uma parede terminal reta e a outra transversa sem prolongamentos e; tipo 3) vasos com paredes terminais tangenciais com prolongamentos, estes não detectados na

outra espécie do gênero, *A. australe*. Em conseqüência, a caracterização da morfologia da planta, do pó da droga e da histoquímica de *A. hispidum* é inédita.

Encarado como matéria-prima, *Acanthospermum hispidum*, mesmo que seja de farta ocorrência nos períodos de chuva, a demonstração de que seu cultivo não sofre alterações do padrão fitoquímico, em relação aos indivíduos de ocorrência espontânea, pode abrir uma perspectiva de comércio para pequenos agricultores, em todo o Estado e durante todas as estações do ano.

A presença de inúmeras lactonas sesquiterpênicas, que a literatura aponta como factível para uso como marcadores, na nossa prática foi substituída pelos esteróides isolados (estigmasterol e o β -sitosterol), que, uma vez validado o método de dosagem a partir do KIT de dosagem de colesterol, poderá ser de grande ajuda no controle de qualidade do produto acabado, principalmente se considerado o baixo custo da análise. Os testes farmacopéicos contribuem para a especificação da droga vegetal garantindo uma padronização do fitoterápico.

A parte da planta aqui estudada (raiz) não apresentou um perfil fitoquímico muito diverso em substâncias. Isto por um lado abrevia a busca de marcadores fitoquímicos, por outro diminui os estudos de caracterização necessários. Ou seja, pode-se restringir à pesquisa de terpenóides e dos polifenóis presentes, que por sua vez, também podem ser utilizados como marcadores.

Apesar de já ter sido antes estudada, a atividade antimicrobiana de *A. hispidum*, estes ensaios foram aqui repetidos, uma vez que agora se faz a utilização da matéria-prima de plantas cultivadas e não mais ruderais, o que poderia ter alterado sua atividade. Os resultados de atividade antimicrobiana para *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis* despertam a atenção para futuros estudos, com outras cepas de ocorrência nos processos respiratórios. Por outro lado, a

determinação da Concentração Mínima Inibitória confirma a ação do extrato para estas duas cepas testadas.

Em relação às pesquisas toxicológicas foi realizado apenas o Estudo de Citotoxicidade, uma vez que na literatura os ensaios de DL₅₀ não foram concluídos, por falta de toxicidade na dose de até 2 g/Kg de peso, em ratos.

O Estudo de Atividade Antiinflamatória Pulmonar sugere uma promissora atividade, talvez devida aos esteróides estigmasterol e β -sitosterol, aproximando-se farmacologicamente à dexametasona comparada, também de natureza esteroideal. Esta atividade foi melhor observada em relação aos neutrófilos, que representam a primeira linha de resposta inflamatória, e aos eosinófilos, responsáveis pela resposta alérgica. Assim, através das substâncias isoladas, será possível o planejamento da linha de estudos biológicos a ser realizada, em futuros trabalhos, para a comprovação e detalhamento destas atividades.

Pelo exposto, não seria absurdo concluir que, na perspectiva das grandes indústrias farmacêuticas, o foco principal da pesquisa diz respeito à descoberta de “novas” moléculas com potencial terapêutico que, certamente reverterão em lucros, a curto e médio prazos. Porém, se buscarmos atender às necessidades dos países em desenvolvimento, onde a limitação dos recursos públicos não prioriza as pesquisas, e as populações são mais vulneráveis às doenças pela falta de investimentos em programas sociais, com todas as suas conseqüências, o mais promissor seria dar mais ênfase às pesquisas sobre a comprovação de segurança e eficácia de extratos brutos de plantas consagradas popularmente, utilizando-se das nossas riquezas botânica e cultural e trabalhando-se com padronizações que garantam a qualidade do produto final, conforme preconiza a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

Nesta perspectiva, a compilação do conhecimento sobre esta espécie estará oferecendo, principalmente, e além de tudo, subsídios

para a farmacovigilância, uma vez que, pela grande quantidade de fornecedores diferentes, o produto já assumiu o status de interesse para a Saúde Pública no Estado de Pernambuco.

Desta forma, os ensaios que visam à identificação da droga, os estudos fitoquímicos, e de toxicidade aguda, juntamente com ensaios pré-clínicos e mais tarde clínicos, que buscassem uma possível ação antiasmática dariam respaldo ao, já consagrado, uso popular do **Espinho-de-cigano**, agora com indicações mais precisas, contra-indicações e doses, envolvendo padronização da matéria-prima e formulação adequada de um produto para as fases seguintes de ensaios clínicos.

Assim, nossas perspectivas de pesquisa apontam para os seguintes trabalhos futuros:

- Prosseguimento da metodologia para validação de doseamento de esteróides para o controle de qualidade;
- Continuação dos ensaios pré-clínicos, agora com os esteróides isolados;
- Estudo de atividade em músculo liso de traquéia isolada;
- Estudo *in vivo* de citotoxicidade com histopatologia;
- Realização de ensaio clínico;
- Registro de produto, e
- Monografia para Farmacopéia Brasileira

CAPÍTULO IX

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, SEI. Toxicity of Indigenous Plants and Agricultural Chemical in Farm Animals. **J Toxicol Clin Toxicol**. v. 13, p. 269 - 280, 1978.

ALLEY, MC. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res**, v. 48, p. 589 - 601 1988.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Registro de Medicamento Fitoterápico Novo**. Resolução: RDC N°48 ANVS/MS, de 16 de março de 2004. D.O.U. de 18/03/2004.

ARANHA, C; BACCHIO, O & LEITÃO FILHO, HF. **Plantas Invasoras de Culturas**. São Paulo: HUCITEC/Min. da Agricultura/Agiplan - BID, v. 2, 1972.

ARAÚJO, EL; RANDAU, KP & XAVIER, HS. Plantas medicinais em destaque: *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae). **Racine**. n. 66, p. 32 - 34, jan/fev, 2002.

ARAÚJO, EL; PISCIOTTANO, MNC; MAIA, MB; *et al.* Avaliação fitoquímica e farmacológica preliminar do *Acanthospermum hispidum* (Espinho de Cigano). **Biológica Brasileira**. v. 1, Supl. 1, p. 181, 1989.

AWADH ALI, NA *et al.* Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, p. 173-179, 2001.

BAKHITA, A & ADAM, SEI. Toxicity of *Acanthospermum hispidum* to mice. **J Comparat Pathol**. v. 88, p. 443 - 448, 1978-1.

BAKHITA, A & ADAM, SEI. Effects of *Acanthospermum hispidum* on goats. **J Comparat Pathol**. v. 88, p. 533 - 44, 1978-2.

BAKSHU, LMD; RAM, AJ; RAJU, RRV. Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 930-933, 2001.

BARANOVA, MA. Historical development of the present classification of morfological types of stomates. **The Botanical Review**, v. 53, p. 53-79, 1987.

BARROS, JFP & NAPOLEÃO, E. **Ewé òrisà: uso litúrgico e terapêutico dos vegetais nas casas de candomblé jêje-nagô**. 2. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.

BARROSO, G.M. *et al.* **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa/MG: Imprensa Universitária, v. 3, 1991.

BARROSO, JG; PEIXOTO, AL; ICHASO, CLF *et al.* Sistemática de Angiospermas do Brasil. In: MIRANDA, L F P. **Análise comparativa da composição química de *Acanthospermum hispidum* DC em suas diferentes**

fenofases, Dissertação de Mestrado em Biologia/Botânica, Instituto de Biologia da UFBA, Salvador, 1996.

BAUER, AM. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **Am J Clinical Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BHAKUNI, DS; DHAR, ML; DHAR, MM. *et al.* Screening of Indian plants for Biological Activity. Part III. In: **Indian J Exper Biol**. n.9, p. 91, 1971.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1978.

BOHLMAN, F; JAKUPOVIC, J; AUTAR, KD. *et al.* Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*. **Phytochemistry**. v. 20, n. 5, p. 1081-1083, 1981.

BOHLMAN, F; JAKUPOVIC, J; ZDERO, C *et al.* Neue Melampolide und *Cis,Cis*-Germacranolide aus vertretern der subtribus Melampodiinae. **Phytochemistry**. v. 18, p. 625 - 630, 1979.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Natal: Editora UFRN, 1976.

BRANDÃO, M; GAVILANES, ML; LACA-BUENDIA, JP *et al.* Plantas daninhas ocorrentes na cultura de trigo (*Triticum aestivum* L) no Estado de Minas Gerais. **Congresso Nacional de Botânica**, 37. Anais. Ouro Preto, MG, p. 159 - 174, 1986-1.

BRANDÃO, M; GUIMARÃES, EF; MAUTOE, L *et al.* Plantas consideradas daninhas ocorrentes na faixa litorânea do Município do Rio de Janeiro. **Congresso Nacional de Botânica**, 37. Anais. Ouro Preto, MG, p. 191-211, 1986-2.

BRANDÃO, VJ; AGRA, MF & BRITO, ARMS. Comparação de dois métodos de avaliação toxicológica de extratos hidroalcoólicos de plantas brasileiras. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 10. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, painel 5/9, 1988.

BREMER, K. Asteraceae: Cladistics and Classification. Portland: Timber Press, 1994, In: NAKAJIMA, JN & SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG, Brasil. **Rev Bras Bot**. v. 24, n. 4, 2001.

BRÜNETON, J **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza/ ES: Acribia, 1991.

BUDEL, JM; DUARTE, MR & SANTOS, CAM, Cunha LM. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from trimera group. **Rev Bras Farmacogn**. v. 13, (Supl. 2), p. 42-43, 2003.

BUDEL, JM; DUARTE, MR & SANTOS, CAM. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Rev Bras Farmacogn**. v. 14, p. 41-48, 2004.

CACERES, A; MENENDEZ, H; COHOBON, E *et al.* Antiogonorrhoeal Activity of Plants Used in Guatemala for the Treatment of Sexually Transmitted Diseases. **J Ethnopharmacol.** v. 48, n. 2, p. 85 - 88, 1995.

CAETANO, NP; MAIA, B; AFIATPOUR, P *et al.* Avaliação fitoquímica, microbiológica e farmacológica preliminar do *Acanthospermum hispidum* (espinho de cigano). **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 11, João Pessoa, 1990.

CARTAGENA, E; BARDON, A; CATALAN, AN *et al.* Germacranolides and a New Type of Guaianolide from *Acanthospermum hispidum*. **J Nat Products.** v. 63, n. 10, p. 1323 - 1328, 2000.

CHIAPPETA, AA *et al.* Efeito do tempo de difusão no teste de atividade antimicrobiana de extratos de *Fuligo septica* (myxomycetes). **Rev. I.A. Série: Ciências Biológicas**, v. 2/3, n. 1/2, p. 53-60, 1999.

CHOWDHURY, D. *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Aerva lanata*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 92-94, 2002.

COIMBRA, R **Manual de Fitoterapia**. 2. ed. Belém: CEJUP, 1994.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**. Rio de Janeiro: Edição de Carlos da Silva Araújo, 1942.

CORRÊA, MP **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**: Rio de Janeiro: Editora Nacional, 1926. Reimpressão MEC/IBAMA, v.6. 1978.

CORRÊA, MP **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**: Rio de Janeiro: Editora Nacional, 1926.

COSTA, OA. Estudo Farmacognóstico do Picão da Praia. **Revista da Flora Medicinal**. Ano VIII, n. 8, p. 209 - 248, 1941.

CRONQUIST, A **An integral system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, GL **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1964.

CUNHA, AG **Dicionário Etimológico Nova Fronteira da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1982.

CUNHA, LHS; BRANDÃO, M; LACA-BUENDIA, JP & GAVILANES, ML Plântulas, frutos, frutos/sementes e sementes de plantas daninhas em pastagens naturais de cerrado no Estado de Minas Gerais. **Congresso Brasileiro de Botânica**, 36. Anais, v.2. Curitiba: Sociedade Botânica do Brasil, 1985.

DEL VITTO, LA; PETENATTI, EM & PETENATTI, ME Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera Parte: Plantas Nativas 1. **Multequina**. n. 6, p. 49 - 66, 1997.

DINIZ, MFFM; OLIVEIRA, RAG; MEDEIROS, ACD *et al.* **Memento Fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos**. João Pessoa: Editora Universitária, 1997.

DI STASI, LC. & HIRUMA-LIMA, CA. **Plantas Medicinais na Amazônia em na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: UNESP, 2002.

DI STASI, LC; SANTOS, EMG; SANTOS, CM. *et al.* **Plantas Medicinais na Amazônia**. São Paulo: UNESPE, 1989.

DUTRA, E A; MARTINS, L S; PIRES, S G *et al.* Ictiotoxicidade de Plantas Medicinais da Região Nordeste. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 14, Florianópolis/SC, seção F-242, p. 143, 1996.

EL TAHIR, A; SATTI, GMH & KHALID, SA Antiplasmodial Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants with Emphasis on *Acacia nilotica*. **Phytother Res.** v. 13, n. 6, p. 474 - 478, 1999.

ESAÚ, K. **Plant anatomy**. New York: John Wiley & Sons, 1965.

ESPINDOLA JR, A. Morfologia e Anatomia Foliar de duas Espécies Medicinais (*Mikania glomerata* Spreng. - ASTERACEAE e *Bauhinia forficata* Link. -LEGUMINOSAE) Associadas à Erva Mate, Sob Diferentes Condições de Luminosidade. **Dissertação de Mestrado** em Botânica, apresentado ao Curso de Pós-graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba. 2006.

EVANS, WC **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: Saunders, 1996.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 4. ed. Oxford: Pergamon Press, 1990.

_____ **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

_____ **FDA - FEDERAL DRUGS ADMINISTRATION (USA)**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html>. Acessado em 20.06.2005.

FELIPE, GM & ALENCASTRO, FMMR. Contribuição ao estudo da nervação foliar das compostas de cerrado. I - Tribos Helinieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecioneae. **An Acad Bras Cienc.** v. 38, p. 125-158, 1966.

FERREIRA, ABH **Novo Aurélio Século XX: o dicionário da língua portuguesa**. 3 ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

FILIZOLA, LRS; PIMENTEL, RMM; RANDAU, KP; XAVIER, HS. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Vernonia brasiliana* (L.) Druce. **Acta Farm Bon.** v. 22, p. 299-303, 2003.

FLEISCHER, TC; AMEADE, EPK & SAWER, IK. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia.** v. 74, p. 130 - 132, 2003.

FONSECA MCM, MEIRA RMSA, CASALI VWD. Anatomia dos Órgãos Vegetativos e Histolocalização de Compostos Fenólicos e Lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha.** v. 24, p. 707-713, 2006.

FOURNET, A; BARRIOS, AA & MUNOZ, V. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Bolivian Medicinal Plants. **J Ethnopharmacol.** v. 41, n. 1/2, p. 19 - 37, 1994.

FURR, M; MAHLBERG, PG. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J Nat Prod.** v. 44, p. 153-159, 1981.

GARCIA, QS Dormência e germinação em aquênio de *Acanthospermum hispidum*. **Dissertação de Mestrado** em Biologia Vegetal na Universidade Estadual de Campinas, 1992.

GARCIA-BARRIGA, H. Flora Medicinal de Colombia. v. 2/3, 1975. **NAPRALERT**, 2003.

GERAN, RI *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems (third edition). **Cancer Chemotherapy Reports**, Maryland (USA), v. 3, n. 2, p. 1-103, 1972.

GERAN, RL *et al.* In: JAKUPOVIC, J; BARUAH, RN; BOHLMANN, F & MSONTHI, JD. Further acanthospermolides from *Acanthospermum hispidum*. **Planta Medica.** p. 154 - 155, 1986.

GOODMAN, LS & GILAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 11. ed. USA, 2006.

HARBORNE, JB. **Phytochemical Methods.** 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HERZ, W & KALYANARAMAM, PS Acanthospermal A and Acanthospermal B, Two New Melampolides from *Acanthospermum hispidum* Species. **J Organic Chemistry.** v. 40, n. 24, p. 3486 - 3491, 1975.

HESS, R.; PEARSE, AGE. Pathways of reduced pyridine nucleotide oxidation in ratbrain homogenate demonstrated by a tetrazolium method. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 71, p. 285-294, 1963.

HOLETZ FB; PESSINI, GL; SANCHES, NR; CORTEZ, DAG; NAKAMURA, CV; DIAS FILHO, BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk

medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 97, p. 1027-1031, 2002.

_____ HORTIPLEX DATABASE. Em: www.hortiplex.com. Acessado em 27/06/2005.

HOUAISS, A & VILLAR, MS. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

HUSSAIN, RA; LIN, Y-M; POVEDA, LJ *et al.* Planta-Derived Sweetening Agents: Saccharide and Polyol Constituents of Some Sweet-Tasting Plants. **J Ethnopharmacol.** n. 28, p. 103 - 115, 1990.

_____ ICBN - International Code of Botanical Nomenclature. Disponível em [http:// www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code](http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code), consultado em 25/05/2005.

_____ IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. Herbário Dárdano de Andrade Lima. Laudo de Identificação da espécie. 1997.

JAKUPOVIC, J; BARUAH, RN; BOHLMANN, F *et al.* Further Acanthispermolides from *Acanthospermum hispidum*. **Planta Medica**. 1986.

JOHANSEN, DA. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOLY, AB. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 8. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1987.

KANDEMIR, A; MAKBUL, S; TÜRKMEN, Z; YILMAZ, M. Morphological, Anatomical and Palynological Investigation on *Sonchus erzincanicus* Matthews (Asteraceae). **Turk J Bot.** v. 30, p. 405-411, 2006.

KHAN, MR; KIHARA, M; OMOLOSO, AD. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 825 - 828, 2001.

KOJIMA, H; SATO, N; HATANO, A. Sterol Glucosides from *Prunella Vulgaris* **Phytochemistry**, v.29, p. 2351-2355, 1990.

KRAUS, JE. & ARDUIM, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997.

KRAUS, W; KOLL-WEBER, M; MAILE, R *et al.* Biologically active constituents of tropical and subtropical plants. **Pure and Applied Chemistry**. v. 66, n. 10/11, p. 2347 - 52, 1994.

LASMAR, LMLBF; CAMARGOS, PAN; GOULART, E; SAKURAI, E. Fatores de risco para readmissão hospitalar de crianças e adolescentes asmáticos. **J. Bras Pneumol.** v. 5, n. 32, p. 391 -9, 2006.

LECOINT, P. **Árvores e plantas úteis**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1947.

- LEMONICA, IP & ALVARENGA, CMD Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC and *Cajanus cajan* (L) Millps in pregnant rats. **J Ethnopharmacol.** v. 43, n. 1, p. 39 - 44, 1994.
- LORENZI, H & MATOS, FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil.** Nova Odessa/SP: Edição do Autor. il. 1982.
- LUO, X-Y & MATSUOMOTO, H. Susceptibility of a broad-leaved weed, *Acanthospermum hispidum* to the grass herbicide fluazifop-butyl. **Weed Biology and Management.** v. 2, n. 2, p. 98 - 103, 2002.
- MARTINEZ-CORVETTO, R. Fertility-Regulating plants Used in Popular Medicine in Northeastern Argentina. **Parodiana.** v. 1, n. 1, p. 97 = 117, 1981.
- MARTINS, LRR; MOURÃO, KSM; ALBIERO, ALM; *et al.* Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). **Rev.Bras. Farmacogn.** v. 16, p. 42-52, 2006.
- MATHUR, SB & BEJARANE, LB. Isolation of Triacontane, N-butyl eicosante and N-heptacosanol from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry.** n. 15, p. 2026, 1976.
- MATOS, FJA. **O Formulário Fitoterápico do Professor Dias da Rocha.** 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
- MEDEIROS, IA; BRANDÃO, VJ; CORTES, SF *et al.* Isolamento do(s) Princípio(s) Farmacologicamente Ativo(s) de *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 10, São Paulo, 1988.
- MELO, EA; MACIEL, MIS; LIMA, VLAG; LEAL, FLL; CAETANO, ACS. & NASCIMENTO, RJ. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 26, p. 639-644, 2006.
- MENUT, C; MOLANGUI, T. *et al.* In: FLEISCHER, TC; AMEADE, EPK & SAWER, IK Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia.** v. 74, p. 130 - 132, 2003.
- MENUT, C; MOLANGUI, T & LAMATY, G. Aromatic plants of Tropical Central Africa XXIV: Volatile constituents of *Acanthospermum hispidum* DC from the Congo. **J. Essencial Oil Res.** n. 7, p. 589 - 592, nov - dec, 1995.
- MESSIAS, AS & NORONHA, CFA. Avaliação do efeito do composto urbano sobre plantas medicinais cultivadas na Estação Experimental de Itapirema - IPA. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 13. Resumos de Temas Livres. S 062, Fortaleza, 1994.

METCALFE CR; CHALK L. **Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, v. 1, 1988.

METCALFE CR; CHALK L. **Anatomy of Dicotyledons: Leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. London. v. 2, p. 782-804, 1965.

METCALFE, C. & CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. v. 2. Oxford: Clarendon Press, 1950.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations **Naturwissenschaften**, n.48, p.569-570, 1961.

MICHEL, O.; GINANNI, R & SERGYSELS, R. Protective effect of sodium cromoglycate on lipopolysaccharide-induced bronchial obstruction in asthmatics. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 108, n. 3, p. 298 - 302, 1995.

MIRANDA, LFP. Análise comparativa da composição química de *Acanthospermum hispidum* DC em suas diferentes fenofases, **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biologia da UFBA, Salvador, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAIR, AGR; RAO, SA; VOIRIN, B *et al.* Polyphenolic Compounds from Leaves of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**. v. 56, n. 4, p. 249 - 250, 1985.

NAIR, AGR; SUBRAMANIAN, SS; BOHLMANN, F *et al.* Naturally Occurring Terpene Derivates. 79: A New Diterpene Galactoside from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry**. v. 15, p. 1776 - 1778, 1976.

NASCIMENTO, SC. Recherche de Pactivité antitumorale de produits de synthese ou d'origine naturelle. Utilisation du SAMBA pour l'analyse de modifications cellulaires induites., 1993. 173 p. **Tese de Doutorado**. Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie, Grenoble (France).

_____ NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. Disponível em: http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics.cgi?. Acessado em 03.09.2005.

NOVY, JW. Medicinal Plants of the Eastern Region of Madagascar. **J Ethnopharmacol**. v. 55, p. 119 - 126, 1997.

ODEBIYI, OO & SOFOWORA, EA. Phytochemical Screening of Nigerian Medicinal Plantas II. **Lloydia**. n. 41, v. 3, p 234 - 246, 1978.

OLIVEIRA, F; AKISUE, G; AKISUE, MK. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, LEA; BANDEIRA, OF; ARAÚJO, EL & XAVIER, HS. Metabólitos Secundários nas sementes das Asteraceae: *Acanthospermum australe* Kuntze e

Acanthospermum hispidum DC. Simpósio Brasileiros de Farmacognosia, 5, Recife/PE. **Resumos do V Simpósio Brasileiros de Farmacognosia**. V. 01, p. 50, 2005.

PEREIRA, ACN Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Acanthospermum hispidum* sobre a resposta imunológica. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Médicas, UNICAMP, 2001.

PEREIRA, *et al* Analysis of *Usnia Fasciata* Crude. Extracts with antineoplastic Activity. **Tokai J. Exp Clin Med.**, v.19, n. 1, 2, p. 47-52, 1994.

PONTES, CAA; MENEZES FILHO, A & COSTA, AM. O processo criativo e a tessitura de projetos acadêmicos de pesquisa. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, Botucatu, SP, v. 9, n. 17, p. 439-449, 2005.

PORTILLO, A; VILA, R; FREIXA, B *et al.* Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 76, p. 93 - 98, 2001.

RAMACHANDRAM NAIR, AG; RAO, SA; VOIRIN, B *et al.* Polyphenolic Compounds from Leaves of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**, v. 56, n. 4, p. 249 - 251, 1985.

RAMACHANDRAM, VS; NAIR, NC Ethnobotanical Observations on Irulars of Tamil Nadu (India). **J Econ Tax Bot.** v.2, p. 183 - 190, 1981.

RAMACHANDRAM NAIR, AG; SUBRAMANAN, SS; BOHLMANN, F *et al.* A New Diterpene Galactoside from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry**. v. 15, p. 1776 - 1778, 1976.

REDDY, DB Control of *Acanthospermum hispidum* with weedicides. **Plant Protection Bulletin**. v. 13, n. 1/4, p. 67 - 8, 1965.

REDDY, MB; REDDY, KR & REDDY, MN A Survey of Plant Crude Drugs of Anantapur District, Andhra Pradesh, Índia. **Inte J Crude Drug Res.** v. 27, n. 3, p. 145 - 155, 1989.

REYNOLDS W; MCLEAN S; POPLAWSKI J; ENRIQUEZ RG; *et al.* Total assignment of ¹³C and ¹H of three isomeric Triterpenol Derivatives by 2D NMR: An investigation of the Potential Utility of ¹H Chemical Shifts in Structural Investigations of complex Natural products. **Tetrahedron**. v. 42, p.3419-3428, 1986.

RICCO, RA; SENA, GA; VAI, VM; WAGNER, ML; GURIN, AA. Taninos Condensados de *Ephedra chilensis* K. Presl (=E. Andina Poepp. Ex May.) - Ephedraceae. **Dominguezia**. v. 18, p. 17-25, 2002.

RIZZO, JÂ; PITANGA, N. Asma. In: Filgueira NA; Costa Jr. JI; Leitão CCS; Lucena VG; Melo HRL; Brito CAA. (Org.). **Conduas em Clínica Médica**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, p. 225-251, 2004.

ROBBERS, JE; SPEEDIE, MK & TYLER, VE. **Farmacognosia e Farmacobiologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROBERTSON, EH; CARTWRIGHT, RA; WOOD, DJ. **J. Sci. Food. Agr.** 7, p. 637-40, 1957.

RUSSEL, JL. Contribution a l'étude botanique et chimiotaxonomique du genre *Verbascum* en Languedoc-Cevenes. **Tese Doutorado**, Universidade de Montpellier I, 1983.

SÁ BARRETO, LCL, XAVIER, HS, BARBOSA-FILHO, JM, BRAZ-FILHO, R. Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) **Rev Bras Farmacog**, n. 15, v.1, p. 51-54, 2005.

SANON, S; OLLIVIER, E; AZAS, N *et al.* Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. **J Ethnopharmacol.** v. 86, p. 143 - 7, 2003-1.

SANON, S; AZAS, N; GASQUET, M; OLLIVIER, E; *et al.* Antiplasmodial activity of alkaloid extract from *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC), two plants used in traditional medicine in Burkina Faso. **Parasitol Res.** v. 90, p. 314 - 317, 2003-2.

SARIAVA, F R S **Dicionário Latino-Português**. 11. ed. Rio de Janeiro/Belo Horizonte: Livraria Garmer, 2000.

SASS, JE. **Botanical Microtechnique**. 2. ed. Ames, Iowa: The Iowa State College Press, 1951.

SCHWERZEL, PJ & THOMAS, PEL Effect of cultivation frequency on the survival of seeds of six weeds commonly found in Zimbabwe Rhodesia. In: VOLL, E; GAZZIERO, DL P & KARAM, D. Dinâmica de populações de Carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum* DC) sob manejo de solo e de herbicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 32, n. 9, set, 1997.

SEAMAN, FC; FISCHER, NH & STUESSY, TF. Systematic implications of sesquiterpene lactones in the subtribe Melampodiinae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 8, p. 263 - 271, 1980.

SENA-FILHO, JG; MELO, JGS; SARAIVA, AM; GONÇALVES, AM; PSIOTTANO, MNC; XAVIER, HS. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Rev.Bras. Farmacogn.** v. 16, p. 506, 2006.

SILVA, SEM; ALMEIDA, DK & PAULO, MQ Estudo Químico, Antimicrobiano e Toxicológico de *Acanthospermum hispidum* DC. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 14, Florianópolis/SC, p. 140, F-232, 1996.

SILVA, MSH & OLIVEIRA, RAG. **Plantas Medicinais na Atenção Primária à Saúde**. João Pessoa: Editora UFPB, 1994.

SLATER, SF; SAWYER, R; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of for different tetrazolium salts. **Biochimical et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.

STEIN, RT. AsmaPediátrica - O impacto das Internações Hospitalares. (Editorial) **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 332, p. 25-6, 2006

----- SEPLANTEC/Governo do Estado da Bahia. **Inventário de Plantas Mediciniais do Estado da Bahia**. Slavador: Sub-Secretaria de Ciência & Tecnologia, 1979.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannis. **Collegium**, p. 483-499. 1912.

SUMMERFIELD, A & SAALMULLERA, A Interleukin-2 Dependent Selective Activation of Porcine Gamma-felta T Lymphocytes by an Extract from the Leaves of *Acanthospermum hispidum*. **Internal J Immunopharmacol**. v. 20, n. 1/2/3, p. 85 - 98, 1998.

SUMMERFIELD, A; KEIL, GM; METTENLEITER, TC *et al.* Antiviral Activity of an Extract from Leaves of the Tropical Plant *Acanthospermum hispidum*. **Antiviral Res**. v. 36, n. 1, p. 55 - 62, 1997.

SULTANBAWA, MUS; WANNIGAMA, GP; BANDARANAYAKE, WM *et al.* Chemical Investigation of Ceylonese Plants. Part XXIX. A Survey of Plants of Sri Lanka (Ceylon) for Alkaloids I. **Lloydia**, v. 41, p. 597 - 633, 1978.

----- SWAMINATHAN RESEARCH FOUNDATION. Disponível em: <http://www.mssrf.org/>. Acessado em 24.06.2005.

TABARELLI, M & SILVA, JMC (Org). **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. Recife: Massangana/ Secretaria de Ciência, Tecnologia & Meio Ambiente, v. 1, 2002.

----- VIA RURAL. Disponível em: <http://www.viarural.com.ar/>. Acessado em 24.06.2005.

VOLL, E; GAZZIERO, DLP & KARAM, D. Dinâmica de populações de Carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum* DC) sob manejo de solo e de herbicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 32, n. 9, set, 1997.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis** - A thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlim. Spinger-Verlag, 1996.

WEISENTHAL, LM. *et al.* A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Câncer Research XVI**. v. 43, p. 749 - 757, 1983.

WILCOX, D; DOVE, B; MCDAVID, D; GREER, D. **Image Tool**. University of Texas Health Science Center. San Antonio, 2002.

_____ World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO, 1998.

XAVIER, HS; SÁ BARRETO, LCB; RANDAU, KP; ARAÚJO, EL. Contribuição à caracterização de taninos hidrolisáveis. **Congresso Nacional de Botânica**, 53, Recife, Resumos, 042, p. 20, Recife, 2002.

XAVIER, HS & ARAÚJO, EL. Avaliação cromatográfica de amostras de extratos fluidos de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) cultivado e de ocorrência espontânea. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 15. Florianópolis, 1998.

XAVIER, HS. *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae): Etude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique. **Tese de Doutorado**, Université de Montpellier I (FR)., 250 p.1988

ZOMLEFER, W B Guide of flowering plant families. In: VERDI, L G; BRIGHENTE, I M C & PIZZOLATTI, M G Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e Biológicos. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 85 - 94, 2005.

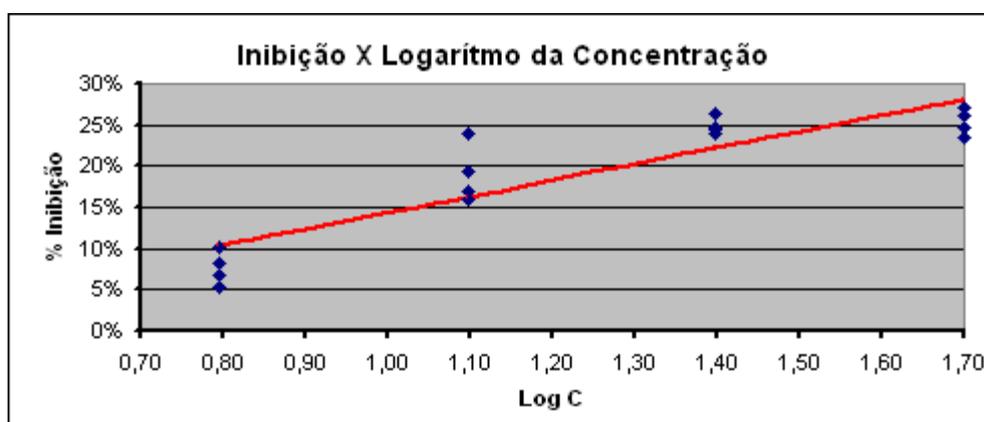
ANEXO I: Relatório Analítico de Atividade Citotóxica

CI₅₀ do padrão frente às células NCI-H292 = 0,0438 µg/mL
Padrão utilizado = Vincristina

Extrato 1: Determinação da CI50

Testes de Citotoxicidade (Células NCI-H292 10⁵ cel/mL)
Filtro : 630

Equação da Retra $y = -0,05088 + 0,194803 * \text{LogC}$



Cálculo da CI-50		
CI 50	Log CI_50	Inibição
673	2,8279	50%

Coef. Correlação = 89%
Valor - P : 0,000
IC = 100,0%

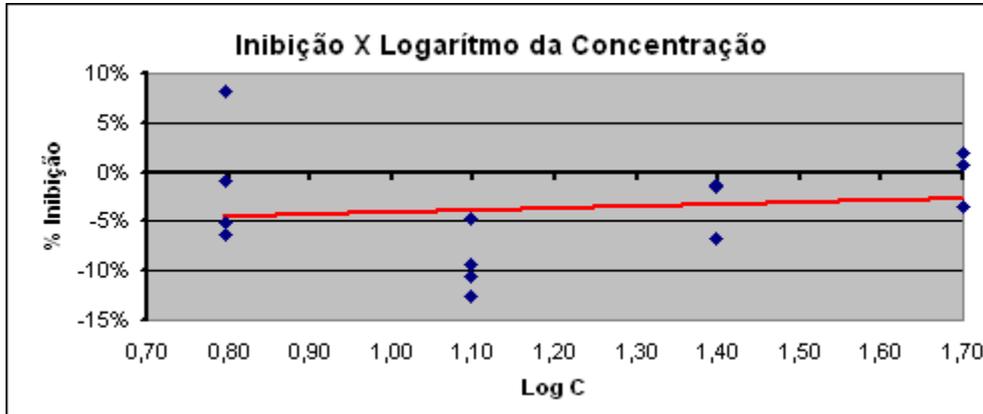
Determinação da CI₅₀ frente à célula NCI-H292, a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição do crescimento celular, em função do logaritmo das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), admitindo-se um intervalo de confiança de 99% (p < 0,01), para a reta obtida.

CI₅₀ da Vincristina frente às células HEp-2 = 0,00279 µg/mL
Padrão utilizado = Vincristina

Testes de Citotoxicidade (Células HEP-2 10⁵ cel/mL)

Filtro : 630

Equação da Reta $y = -0,06131 + 0,020767 * \text{LogC}$



Cálculo da CI-50		
CI 50	Log CI_50	Inibição
#####	27,0290	50%

Coef. Correlação = 14%
 Valor - P : 0,602
 IC = 39,8%

Determinação da CI₅₀ frente à célula HEP-2, a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição do crescimento celular, em função do logaritmo das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), admitindo-se um intervalo de confiança de 99% (p < 0,01), para a reta obtida.

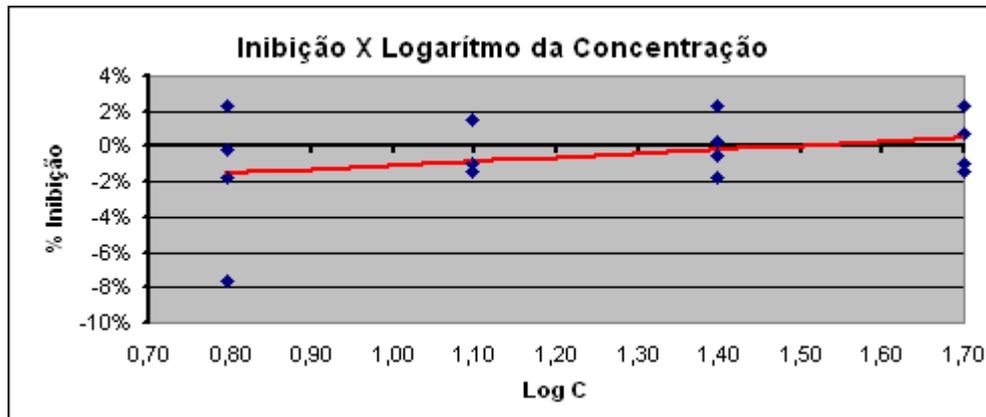
O valor da CI₅₀ não pode ser determinado em virtude da total ausência de citotoxicidade do produto frente as células HEP-2. Os valores médios de inibição em qualquer das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) não apresentaram diferenças. Por esta razão não é possível a determinação da CI₅₀.

CI₅₀ da Vincristina frente às células VERO = não testado ainda µg/mL
 Padrão utilizado = Vincristina,

Testes de Citotoxicidade (Células Vero 10⁵ cel/mL)

Filtro : 630

Equação da Reta $y = -0,03176 + 0,02131 * \text{LogC}$



Cálculo da CI-50		
CI 50	Log CI_50	Inibição
#####	24,9535	50%

Coef. Correlação = 31%
 Valor - P : 0,244
 IC = 75,6%

Determinação da CI₅₀ frente a célula **Vero**, a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição do crescimento celular, em função do logaritmo das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL), admitindo-se um intervalo de confiança de 99% (p < 0,01), para a reta obtida.

O valor da CI₅₀ não pode ser determinado em virtude da total ausência de citotoxicidade do produto frente às células VERO. Os valores médios de inibição em qualquer das concentrações testadas (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) não apresentaram diferenças. Por esta razão não é possível a determinação da CI₅₀.

ANEXO II: Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 77/07

Recife, 21 de agosto de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Evani de Lemos Araújo**
Departamento de Ciências Farmacêuticas/Programa de Pós-Graduação - UFPE
Processo nº 009826/2007-31

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da Atividade Antiinflamatória Pulmonar do Extrato Bruto de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae)**”.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO III: Laudo de Identificação da espécie



EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Vinculada à Secretaria de Agricultura

Av. Gal. San Martin, 1371 - Bongi - 50761-000 - Recife - PE - C.P. 1022 - CGC 10.912.293/0001-37

Telefone: PABX (081) 445-2200 - FAX (081) 445-6030 - Telex: (81) 2263



Acanthospermum hispidum DC.

ESPINHO DE CIGANO

Prod. v. 522. 1836.

Família: ASTERACEAE

Descrição:

Erva anual, ereta, ramificada dicotomicamente com 0,2-1,0 m de altura; caule cilíndrico sulcado apresentando pêlos hispídeos-translúcidos em toda a sua extensão, com 0,35-0,4 cm de diâmetro. Folhas opostas sésseis; lâmina inteira, membranácea, ovada-oblonga, com base atenuada e ápice obtuso ou ligeiramente agudo, margem serreada ou sub-inteira, ciliada, face adaxial com pêlos hispídeos-translúcidos e abaxial densamente hispídeos, com pontuações glandulares especialmente na abaxial, triplinérvia, com nervuras salientes em ambas as faces, com 1,5-8,0 cm de comprimento e 0,5-4,0 cm de largura. Inflorescência em capítulos solitários, axilares na bifurcação dos ramos, curtamente pedunculados a sub-sésseis com pêlos hispídeos, com cerca de 0,4 cm de comprimento e 0,08 cm de diâmetro. Capítulos com brácteas involucrais 12-14, em 2 séries, verde-escuros, as exteriores 5, membranáceas, ovadas, com ápice agudo a obtuso, ciliadas, hispídeo-pubescentes na face externa com cerca de 0,45 cm de comprimento e 0,15 de largura; as da série interna cerca de 8, envolvendo todo o ovário das flores marginais. Receptáculo levemente convexo, pleáceo, com cerca de 0,15 cm de diâmetro. Pálea obovada, lacerada ciliada, pubescente glandular, com cerca de 0,18 cm de comprimento e 0,08 cm de largura. Flores

dimorfas, as do raio femininas cerca de 8, liguladas, amareladas, com ápice bidenteado, pubescente na face exterior próximo aos lacínios e denso pubescente na região basal, lígula com cerca de 0,12 cm de comprimento e 0,08 cm de largura, tubo curtíssimo; estilete glabro amarelado, com cerca de 0,08 cm de comprimento. Flores do disco hermafroditas 5-7, funcionalmente masculinas por esterilidade do gineceu, tubulosas, amareladas, denteadas, com cerca de 0,2 cm de comprimento e 0,1 cm de largura, lacínios 4-5, com cerca de 0,05 cm de comprimento; apresentando na face externa pêlos glandulosos-estipitados na região apical e esparso-híspidos em toda extensão do tubo; estilete brevíssimo bilobado, amarelado, com papilas engrossadas na parte superior, com 0,10-0,15 cm comprimento; anteras com ápice obtuso a agudo e base obtusa-auriculada, negras, com 0,10-0,15 cm de comprimento. Aquênios de 2 tipos: os das flores do raio férteis, obovados comprimidos, bicorniculados, de base afilados e ápice alargado, com seção quadrangular, coberto por numerosas cerdas em forma de gancho, rígidas de cerca de 0,15 cm de comprimento, com pêlos glandulares entre as cerdas, esverdeados, com 0,5-0,6 cm de comprimento e 0,25-3,0 cm de largura; papus aristados, formado por 2 cerdas grandes divergentes, rígidas, uma reta e a outra com o ápice levemente recurvado para fora, com cerca de 0,45 cm de comprimento; aquênios das flores do disco estéreis obovado-oblongos, comprimidos, com seção quadrangular, esverdeados, apresentando pêlos glanduloso-estipitados, com cerca de 0,12 cm de comprimento e 0,02 cm de largura; papus nulo. (Pereira, 1989).

Recife, 09 de Abril de 1997.



Valdelice Correia Lima
Curadora do Herbário IPA - Dárdano de Andrade Lima

***Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product**

Evani de L. Araújo¹, Karina P. Randau¹, José G. Sena Filho¹, Rejane M. Mendonça Pimentel² & Haroudo S. Xavier¹

¹ Pharmacognosy Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, 50740-521 Recife-PE, Brazil. ² Phytomorphology Laboratory, Biology Department Federal Rural University of Pernambuco, Av. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife- PE, Brazil.

RESUMO: “*Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectivas para um produto fitoterápico”. A planta “Espinho-de-cigano” (*Acanthospermum hispidum* DC) é amplamente usada no nordeste do Brasil como medicamento popular para a asma. Embora muito pouco seja conhecido atualmente sobre a eficácia e segurança deste extrato vegetal, é possível encontrar numerosos medicamentos preparados com ele nos serviços públicos ou em lojas que vendem produtos naturais. Este estudo visa proceder a uma revisão de literatura relativa à *A. hispidum*, no período entre 1926-2006, nas áreas de etnobotânica, fitoquímica e farmacologia. O objetivo foi contribuir para um melhor conhecimento desta espécie e seus usos, assim como auxiliar na melhora de seu desempenho como um medicamento natural. A espécie é facilmente identificável e cresce abundantemente durante a estação chuvosa no nordeste do Brasil; é possível cultivá-la sem perda de seu perfil fitoquímico e os estudos toxicológicos têm mostrado sua segurança como um medicamento (embora mais estudos sejam requeridos nestes aspectos). Assim sendo, a compilação do conhecimento acumulado relativo a esta espécie auxiliará na avaliação de seu valor farmacológico, garantindo o controle de qualidade do produto final, e no preparo das recomendações para usos e dosagens que ofereçam segurança e eficiência ao usuário.

Unitermos: *Acanthospermum*, Asteraceae, plantas medicinais, fitoquímica, asma.

Padronização Farmacognóstica das Raízes de *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae)

Evani de Lemos Araújo¹, Karina Perrelli Randau², Haroudo Satiro Xavier³, Clébio Pereira Ferreira⁴, Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel⁵

Resumo

Acanthospermum hispidum é um representante da família Asteraceae que ocorre em várias regiões do nordeste do Brasil. Suas raízes são utilizadas como matéria-prima na produção de xarope antiasmático em diversos serviços de saúde pública, sendo amplamente comercializada no Estado de Pernambuco. Este estudo objetivou a padronização das raízes de *A. hispidum*, permitindo o reconhecimento seguro desta espécie. As análises macro e microscópica das raízes, juntamente com a histoquímica, caracterizaram a matéria-prima, complementando com a determinação do teor de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, determinação da perda por dessecação, testes de pureza e, finalmente, uma prospecção fitoquímica. Os resultados obtidos podem ser utilizados como parâmetros no controle de qualidade de matérias-primas para este fitoterápico.

Palavras-Chave: *Acanthospermum hispidum*, Espinho de cigano, controle de qualidade, fitoterápicos.

¹) Médica, Doutoranda em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, UFPE. evani@hotlink.com.br. Rua Prudente de Moraes, 352. Carmo, Olinda/PE. CEP: 53020-140. Tel.: 55 81 34290434. ²) Farmacêutica, Dra. em Ciências Naturais, Laboratório de Farmacognosia, UFPE; ³) Farmacêutico, Prof. Dr. em Ciências Farmacêuticas e Biológicas, Laboratório de Farmacognosia, UFPE; ⁴) Biólogo, Mestrando em Botânica, Laboratório de Fitomorfologia Funcional, UFRPE; ⁵) Bióloga, Prof. Dra. em Botânica, Laboratório de Fitomorfologia Funcional, UFRPE.

**ANEXO VI: Resumo Publicado em Congresso: The XI International Congress
Phytopharm 2007 27-29 June 2007 Leiden, The Netherlands**

**Contribution to Quality Control of Syrup from *Acanthospermum
hispidum* (Asteraceae)**

Evani de L. Araújo^a, José G. Sena Filho^{a,b}, Karina P. Randau^a, Jose M. Barbosa Filho^b & Haroudo S. Xavier^a

^a Federal University of Pernambuco State, Av. prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, 50740-521 - Recife-PE, Brazil. ^b Federal University of Paraíba State, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica- Caixa Postal 5009, 58051-970 - João Pessoa-PB, Brazil.

The “Espinho-de-cigano” roots (*Acanthospermum hispidum* DC) is used throughout northeastern Brazil as a folk remedy for asthma, mainly for children. Although very little is actually known about the effectiveness and safety of this vegetable extract product, it is possible to find numerous medicines prepared from it in public health services or in stores selling natural products¹. The aim of this study was evaluate the syrup made up from this species, found in the local area. The methodology ^{2,3} used was to compare the roots of *Acanthospermum hispidum* (raw material) cultivated to four products largely used by the population through different techniques since phytochemistry screening to organoleptic characters and physical chemistry characteristics⁴. The phytochemical screening from the raw material were detected the presence of mono and sesquiterpenes, triterpenes, steroids, reductors sugars, flavonoids, phenylpropanoids, cynamic derivate. We also report the presence of β -sytosterol, timol derivates, verbascosides, and clorogenic acid. It was not detect the presence of alkaloids, coumarins, tannins, proanthocyanidins, and leucoanthocyanidins. Due to a high content of sesquiterpenes lactones on the species, it was used as phytochemical marker. Four different syrups evaluated were observed different presentation in the viscosity, odor, flavor, coloration. Among them, only one product commercialized was compatible to the raw material phytochemical standard. In conclusion, it were evidenced the necessity to improve researches, in order to contribute the quality control of specific products. In addition, do not putting in risk the local health to a medicine without security and proved efficacy in almost two decades commercialized in the northeast of Brazil.

References

1. Araújo, E.L.; Randau, K.P.; Xavier, H.S.; 2002. Plantas medicinais em destaque: *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae). *Racine* 66: 32-34
2. Harborne, J.B.; Phytochemical methods. 3.ed. London: Chapman & Hall. 1998
3. Wagner, H.; Bladt, S.; Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas, Springer: Munich, 2^aed. 1996
4. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO, 1998

Anatomia de tricomas na identificação de *Acanthospermum hispidum* DC. e *Acanthospermum australe* (Loef) O. Kuntze (Asteraceae-Heliantheae)

¹Evani Araújo^(PG), ¹Haroudo Xavier^(PQ), ²Clébio Ferreira^(PG), ¹Karina Randau^(PQ), ²Rejane Pimentel^(PQ)

Acanthospermum hispidum e *A. australe* ocorrem em diversas partes do nordeste do Brasil e são usadas principalmente como antitussígenas e contra o cansaço. São freqüentemente tratadas, indistintamente, pelo mesmo nome vulgar. Plantas de *Acanthospermum* são anuais, herbáceas, eretas ou prostradas. As folhas são simples, opostas, com bordas inteiras ou serreadas, inflorescência axilar ou terminal, com flores amareladas. O fruto é um aquênio, oblongo, com cerdas persistentes e rijas. Este estudo apresenta uma distinção entre *Acanthospermum hispidum* e *A. australe* baseada na anatomia dos tricomas. Nas folhas de ambas as espécies, nas faces adaxial e abaxial, e no caule existem tricomas simples, unisseriados, de tamanhos variados, com célula apical aguda (Fig. A) e tricomas glandulares diferenciados. Em folhas e caule de *A. australe*, os tricomas glandulares são sésseis, unicelulares e capitados (Fig. B); nas folhas de *A. hispidum* estes tricomas são sésseis, multicelulares, unisseriados, com forma arredondada (Fig. C). Nesta última espécie, no caule, também são encontrados tricomas glandulares pedunculados, constituídos por 2-3 células no pedúnculo, encimado por uma célula vesicular arredondada (Fig. D). A identificação dos caracteres destes tricomas glandulares pode ser utilizada como uma característica taxonômica adicional para uma segura identificação dos dois taxa.

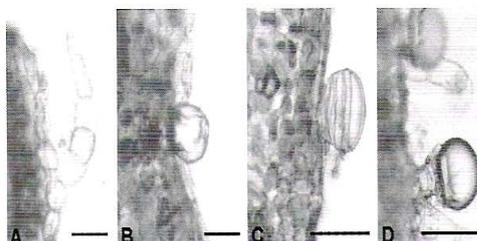


Figura 1. Tricomas em espécies de *Acanthospermum*. A. Tricomas simples, unisseriados, de tamanhos variados, com célula apical aguda, no caule de *A. hispidum* e *A. australe* e nas folhas de *A. australe*. B. Tricomas glandulares são sésseis, unicelulares e capitados, no caule e folha de *A. australe*. C. Tricomas são sésseis, multicelulares, unisseriados, com célula apical arredondada, nas folhas de *A. hispidum*. D. Tricomas glandulares pedunculados, constituídos por 2-3 células no pedúnculo, encimado por uma célula vesicular arredondada, no caule de *A. hispidum*. Barras: A,B,C,D = 50 μ m.

Apoio financeiro: Capes/UFRPE.

Palavras-chave: *Acanthospermum*, Asteraceae, Tricomas foliares.

1- Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 50740-521, Recife, Pernambuco, Brasil; 2- Laboratório de Fitomorfologia Funcional, Departamento de Botânica; Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil

Morphoanatomical Traits to the Quality Control of an Anti-asthmatic Traditional Medicine Using *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae)

E. de L. Araújo^a, H. S. Xavier^a, C. P. Ferreira^b, K. P. Randau^a, and R. M. de M. Pimentel^b

^aPHARMACOGNOSY LABORATORY, PHARMACEUTICAL SCIENCES DEPARTMENT, FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO - UFPE, 50740-521, RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL.

^bFunctional Phytomorphology Laboratory, Botany Department, Federal Rural University of Pernambuco – UFRPE, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil.

Summary

Acanthospermum hispidum and *A. australe* (Asteraceae) are widely distributed in arid regions in northeastern Brazil, and the first specie is used as traditional medicine in consequence of its proven anti-asthmatic activity. They are frequently confounded and probably used indifferently for the same therapeutic purposes due to both having similar characteristics. Comparative morphoanatomical and macerate features of the vegetative organs, following usual methodology, were analyzed which might provide an accurate identification, analysis and standardization of *A. hispidum* stem and leaves in order to obtain phytotherapeutic drugs, and the crude drug as well. A sessile leaf in *A. hispidum* is a diagnostic distinguishing feature. Macerate diagnosis showed specific types of xylem vessels in root, stem and leaf of both species. The types of glandular trichomes can distinguish these species. A microscopic analysis can be safely used to distinguish these species when analyzing a crude drug of doubtful composition.

Key words: *Acanthospermum hispidum*, *A. australe*, anti-asthmatic, macerate, standardization, traditional medicine.

ANEXO IX: Artigo a ser Submetido: Journal of Ethnopharmacology

Artigo em fase de composição

**Avaliação de Atividade Antiinflamatória Pulmonar de
Acanthospermum hispidum DC (Asteraceae)**

E.L. Araújo^a, H.S. Xavier^a, K.P. Randau^a, M.B.S. Maia, N.G. Morias^b & C.M.M.B. Castro^b

^aPHARMACOGNOSY LABORATORY, PHARMACEUTICAL SCIENCES DEPARTMENT, FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO - UFPE, 50740-521, RECIFE, PERNAMBUCO, BRAZIL.

^bKeizo Asami Immunology Laboratory, Federal University of Pernambuco - UFPE, 50740-521, Recife, Pernambuco, Brazil

Key words: *Acanthospermum hispidum*, anti-asthmatic, LPS, anti-inflammatory activity,

Araújo, Evani de Lemos

Acanthospermum hispidum DC (Asteraceae): validação para fins farmacêuticos / Evani de Lemos Araújo. - Recife: O Autor, 2007.

xiii, 116 folhas; il., tab., fig., quadros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Acanthospermum* - Farmacognosia. 2. Medicamento antiasmático. I. Título.

615.234

CDU (2.ed.)

UFPE

615.321

CDD (20.ed.)

CCS2007-16