

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

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de esteroides por espectrofotometria na droga vegetal e produtos derivados de
Acanthospermum hispidum

LARISSA BABYANA DINIZ CABRAL DE ARAÚJO

Recife

2013

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

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de esteróides por espectrofotometria na droga vegetal e produtos derivados de
Acanthospermum hispidum

LARISSA BABYANA DINIZ CABRAL DE ARAÚJO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Recife

2013

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A663d Araújo, Larissa Babyana Diniz Cabral de.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de esteróides por espectrofotometria na droga vegetal e produtos derivados de *Acanthospermum hispidum* / Larissa Babyana Diniz Cabral de Araújo. – Recife: O autor, 2013.
106 f. il.; quadr.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Fitosteróis. 2. Estudos de validação. 3. Espectrofotometria. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-104)

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

Recife, 26 de fevereiro de 2013.

Defesa de dissertação de Mestrado de **Larissa Babyana Diniz Cabral de Araújo** defendida e APROVADA por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2013 e cuja Banca examinadora foi construída pelos seguintes professores:

Presidente e Primeiro Examinador Interno **Prof. Dr. Dr. Luiz Alberto Lira Soares –**
(Dpto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE)

Segundo Examinador Interno **Profa. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim –**
(Dpto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE)

Primeiro examinador Externo **Prof. Severino Granjeiro Júnior–**
(Dpto. de Ciências Farmacêuticas da Faculdade Pernambucana de Saúde)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pró-Reitor: Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Nélcio e Elzi.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus, por estar comigo em todos os momentos e iluminando-me, sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis.

A minha família, aos meus pais Nélio Araújo e Elzi Araújo, meus irmãos, Luis Felipe e Danilo Araújo, pelo apoio e compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho, ao meu amigo e namorado Raphael Ferreira, pelo seu incentivo e carinho.

Ao meu orientador Prof. Luiz Alberto de Lira Soares pela orientação e paciência.

A minha co-orientadora Profa. Karina Perrelli Randau pelo apoio e ensinamentos.

Aos meus queridos colegas de Laboratório, Marcos Galvão, Isabelle Ferraz, Alex Lucena, Waleska Leão, Vanessa Luna, Rafaela Damasceno, Yasmine Alves, Bárbara Nunes, Andrea Vidal, Layane Feitosa, Júlia Souza, Gustavo Dimech pela convivência maravilhosa, em especial a Magda Ferreira, Sarah Luanne e Camila Almeida.

Aos meus queridos amigos da graduação de Farmácia, Patrícia Magalhães, Clara Marques e Marcos Cardoso.

Aos funcionários da coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Nerilin Trajano.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os fitosteróis são substâncias esteroidais ou terpenoides tetracíclicos extraídos de espécies vegetais. A espécie vegetal *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) é frequentemente empregada na medicina popular, devido à sua propriedade antiasmática, a qual se acredita que está relacionada com o teor de fitosteróis. Apesar do potencial farmacológico, não há relatos na literatura de especificações no que diz respeito ao seu controle de qualidade. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de fitosteróis totais por espectrofotometria UV-Vis para a matéria-prima vegetal e produtos derivados das raízes de *A. hispidum*. Após confirmação de identidade, o material vegetal foi submetido à triagem fitoquímica por CCD e caracterização físico-química. Em seguida, uma metodologia para determinação espectrofotométrica de fitosteróis após reação com reagente de Liebermann-Burchard (LB), foi avaliada e validada de acordo com os parâmetros preconizados na RE nº 899 e ICH. A realização da triagem fitoquímica confirmou a presença de fitosteróis na droga vegetal e produtos derivados de *A. hispidum*, sugerindo a adequação destes compostos como marcadores químicos para o controle de qualidade da espécie. O método analítico, desenvolvido e validado empregando a droga vegetal caracterizada (umidade residual = 9,51%; diâmetro de partícula = 580 µm; teor de extrativos = $4,72 \pm 0,153$ (3,24%); cinzas totais = 4,66%; cinzas insolúveis em ácido = 0,1525%), apresentou linearidade ($R^2 > 0,99$), precisão e exatidão de acordo com os limites preconizados ($CV\% < 5\%$). Por fim, o método pôde ser considerado robusto em relação à marca de solvente e comprimento de onda ($CV\% < 5\%$). Dessa forma, considerando a simplicidade e baixo custo de execução, a adoção da técnica espectrofotométrica figura como alternativa válida para análise de fitosteróis totais em raízes e produtos derivados de *A. hispidum*.

Palavras chaves: Fitosteróis. Estudos de validação. Espectrofotometria.

ABSTRACT

Phytosterols are steroidal substances or tetracyclic terpenoids extracted from plant species. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) species is frequently used in folk medicine, due to its antiasthmatic property, which is believed to be related to phytosterols content. Despite the pharmacological potential interest in the pharmaceutical community, the species is not reported in official monographs, and do not meet the minimum requirements of the health legislation in force with regard to quality control. Thus, the objective of this study was to develop and to validate analytical methodology for the measurement of total phytosterols by UV-Vis spectrophotometry for the raw material and products derived of the roots from *A. hispidum*. After confirming the identity of the plant material, it was subjected to phytochemical screening by TLC and physicochemical characterization. Then, methodology for spectrophotometric determination of phytosterols after reaction with a Liebermann-Burchard reagent (LB) was evaluated and validated in accordance with to the parameters established in the RE n. 899 and ICH. The phytochemical screening confirmed the presence of phytosterols in herbal drug and products derived from *A. hispidum*, suggesting the suitability of such compounds as chemical markers for the quality control of species. The analytical method, developed and validated using the vegetable drug characterized (residual moisture = 9.51%, diameter = 580 μm ; extractives content = 4.72 ± 0.153 (3.24%), total ash = 4.66%; acid insoluble ash = 0.152%) showed linearity ($R^2 > 0.99$), precision and accuracy in accordance with the limits prescribed (RSD% < 5%). Finally, the method could be considered robust against mark of solvent and wavelength (RSD% < 5%). Thus, considering simplicity and low cost of implementation, the adoption of spectrophotometric techniques should be used as a valid alternative for analysis of total phytosterols from roots and products derivative *A. hispidum*.

Key-words: Phytolsterols. Validation studies. Spectrophotometry.

LISTA DE QUADROS

Capítulo I

Revisão de Literatura

Quadro 1. Posição taxonômica de <i>Acanthospermum hispidum</i>	23
Quadro 2. Sinonímia científica de <i>Acanthospermum hispidum</i>	24
Quadro 3. Sinonímia popular de <i>Acanthospermum hispidum</i> no Brasil.....	25
Quadro 4. Compostos químicos relatados em <i>Acanthospermum hispidum</i>	26

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Manuscrito I

Tabela 1. Calibration dada for standard (β -sitosterol) and both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	62
Table 2. Repeatability test: total phytosterol content (TPC g%) for both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	62
Tabela 3. Intermediate precision test: total phytosterols content (TPC g%) for both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	67
Tabela 4. Accuracy test: recovery (%) for both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	67
Table 5. Robustness test: total phytosterols content (TPC %) for both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	68

CAPÍTULO IV

Manuscrito II

Tabela 1. Resultados em média do teor de fitosteróis (g%) obtidos na precisão intermediária.....	84
Tabela 2. Resultados em média para exatidão (%) para fração <i>n</i> -hexânica de xarope.....	85
Tabela 3. Resultados em média do teor de fitosteróis (g%) da robustez, para as fontes de variação marca do solvente e comprimento de onda para leitura das amostras.....	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. <i>Acanthospermum hispidum</i> , indivíduo adulto: (a) Inflorescência; (b) planta com aproximadamente 2 meses de cultivada; (c) raízes; (d)folhas.....	22
Figura 2. Estrutura química dos principais fitosteróis.....	30
Figura 3. Núcleo esteroidal de substâncias esteroidais.....	30
Figura 4. Unidade básica de formação de fitosteróis.....	31

CAPÍTULO II

Figura 1. Resultados de distribuição granulométrica das raízes de <i>Acanthospermum hispidum</i>	43
Figura 2. Curvas de retenção e passagem das raízes de <i>Acanthospermum hispidum</i>	44
Figura 3. Cromatograma de extrato hidroetanólico de <i>Acanthospermum hispidum</i> ..	45

CAPÍTULO III

Manuscrito I

Figure 1. Spectrum for Liebermann-Burchard reactional product (400-900nm): herbal material and extractives from roots of <i>A. hispidum</i> roots.....	58
Figure 2. Influence of reaction time on the method response (absorbance) for Kinetic of reaction time to samples and standard, where x is the unit of time in minutes and y = absorbance (UA).....	59
Figure 3. Influence of Liebermann-Burchard reagent on total phytosterol content (TPC g%) for standard (β -sitosterol) and both herbal drug and extractives from roots of <i>A. hispidum</i>	60
Figura 4. Spectrum for Liebermann-Burchard reactional product (400-900nm): reference solution (β -sitosterol), herbal material and extractives from roots of <i>A. hispidum</i> roots.....	61

CAPÍTULO IV

Manuscrito II

Figura 1. Determinação do comprimento de onda construído de amostras contendo padrão (β -sitosterol), extrato hidroetanólico e fração <i>n</i> -hexânica de xarope contendo raízes de <i>A. hispidum</i> na região de 400 a 900 nm.....	79
Figura 2. Resultados da determinação do tempo de reação para fração <i>n</i> -hexânica de xarope de raízes de <i>A. hispidum</i>	80
Figura 3. Resultados para proporção do reagente Liebermann-Burchard. Teor de fitosteróis totais (TFT(g%)).....	81
Figura 4. Curva de calibração para solução de referência (β -sitosterol).....	82
Figura 5. Linearidade para fração <i>n</i> -hexânica de xarope de raízes de <i>A. hispidum</i> (3,136- 9,408 mg/mL).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LB	Liebermann-Burchard
RE	Resolução Específica
ICH	International Conference on Harmonization
Fr-EtOAc	Fração acetato de etila
Fr-MeOH	Fração metanólica
EtOH	Etanol
(PrV)	Vírus pseudorraiva
(BoHV-1)	Herpesvírus bovino tipo1
IC ₅₀	Concentração Inibitória em 50% da amostra
DPOC	Doenças Pulmonares Obstrutivas
DL ₅₀	Dose letal para 50% da amostra
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UV	Ultravioleta
EM	Espectroscopia de Massas
CG	Cromatografia Gasosa
Vis	Visível
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
Pa	Peso da amostra
Pu	Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação
Ps	Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.
FD	Fator de diluição
DP	Desvio padrão
CV	Coeficiente de variação
R _f	Razão de frente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
R ²	Coeficiente de Correlação
A	Absorbância
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
DPa	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
IC	Média dos coeficientes angulares
F tab	F tabelado
F calc	F calculado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 CAPÍTULO I.....	20
3.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
4 CAPÍTULO II.....	34
4.1 Controle de qualidade de raízes de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC (Asteraceae).....	35
5 CAPÍTULO III.....	50
5.1 Manuscrito I - Quantificação de fitosteróis totais em raízes de <i>Acanthospermum hispidum</i> DC por UV-VIS.....	51
6 CAPÍTULO IV.....	69
6.1 Manuscrito II - Teor de fitosteróis totais em xarope de raízes de <i>Acanthospermum hispidum</i>	70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

Acanthospermum hispidum DC, conhecido popularmente como “Espinho-de-cigano” tem o emprego de suas raízes em forma de xarope, para o tratamento da asma (ARAÚJO et al, 2002). Por esta razão, a espécie vem despertando interesse em pesquisas de atividade biológica, no qual acredita-se que suas propriedades antiasmáticas estão relacionados com o teor de esteróis em suas raízes.

Os esteróis são substâncias presentes e essenciais nas membranas celulares de animais e vegetais. Em plantas superiores, os primeiros esteróis foram isolados por Hesse em 1878, e nominados com o termo fitosterine. Posteriormente, em 1906, essa substância foi renomeada de stigmasterol por Windaus e Hault. A denominação fitosterol foi proposta por H. Thoms, em 1897, para todos os esteróis de origem vegetal (PIIRONEN; TOIVO; LAMPI, 2000). Estes metabólitos são derivados do anel ciclopentanoperidrofenantreno, apresentam-se semelhante à estrutura do colesterol. Nos alimentos, os fitosteróis podem existir em quatro formas: esteróis livres, esteril-glicosídeos esterificados, esteril-glicosídeos e estéril-glicosídeos acilados (MOREAU et al., 2002; PHILLIPS et al., 2005).

Apesar do potencial farmacológico de *A. hispidum*, não há relatos na literatura acerca de especificações no que diz respeito ao seu controle de qualidade (ARAÚJO et al., 2007). Desta forma, o desenvolvimento e validação de método para quantificação de seus compostos esteroidais é fundamental para que seja possível a padronização de seus extratos.

Em virtude das propriedades terapêuticas dos fitosteróis como antiasmáticos e antitumorais, o interesse em quantificá-los tem crescido, existem vários métodos para a determinação de fitosteróis, sendo a maior parte deles baseados em análises cromatográficas (FIRESTONE, 1998; ABIDI, 2001; LEMBCKE et al., 2005; LIU; RUAN, 2013; LAGARDA et al., 2006). No entanto, a literatura relata diversas limitações das técnicas cromatográficas, entre as quais destaca o custo operacional elevado. Como alternativa para esse problema, a adoção de técnicas para quantificação por espectrofotometria UV/Vis, no qual é um método amplamente utilizado em laboratórios de controle de qualidade devido à sua simplicidade e baixo custo de implementação tem se consolidado (KOMAROVA et al., 2009; SILVA et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; MARQUES et al., 2013).

Neste sentido, Araujo (2007) isolou o β -sitosterol de raízes de *A.hispidum* e realizou estudos de atividade biológica, através do qual foi possível observar que a presença da substância esteroideal justificaria a significativa ação do extrato bruto. O estudo foi conduzido comparativamente com outro esteroide (dexametasona) em modelo de ação anti-inflamatória em lavado alveolar de ratos. Os dados estão de acordo com a hipótese de Bouic e Lamprecht (1999), que constataram que o β -sitosterol melhorava atividade de linfócitos-T e células natural *killer*, assim como é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e fator de necrose tumoral-alpha (BOUIC, 1998). Adicionalmente, o uso da planta se mostra seguro quanto ao ensaio de DL₅₀ até 2g/kg em animais (ARAÚJO et al., 1989, ARAÚJO et al., 2007).

Assim, considerando a importância terapêutica dos fitosteróis e a ausência de estudos sobre o controle de qualidade da espécie, seja como matéria-prima ou produtos derivados, o objetivo principal deste estudo foi desenvolver e validar metodologia analítica por espectrofotometria UV/Vis para quantificação de fitosteróis presentes na droga vegetal das raízes de *A. hispidum*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de esteroides presentes na matéria-prima e produto acabado de *Acanthospermum hispidum* por espectrofotometria UV-Vis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem fitoquímica para fitosteróis e caracterização físico-química das raízes de *A. hispidum*;
- Desenvolver e validar método analítico quantitativo para fitosteróis totais presentes em raízes da droga vegetal *A. hispidum* por espectrofotometria UV-Vis;
- Desenvolver e validar método analítico quantitativo para fitosteróis totais presentes em extrato hidroetanólico de raízes de *A. hispidum* por espectrofotometria UV-Vis;
- Desenvolver e validar método analítico quantitativo para fitosteróis totais presentes em fração *n*-hexânica de xarope de raízes de *A. hispidum* por espectrofotometria UV-Vis.

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *Acanthospermum hispidum*

Acanthospermum hispidum, pertence a família Asteraceae e gênero *Acanthospermum* (LEITÃO FILHO; ARANHA; BACCHI, 1972).

Asteraceae é a maior família de angiospermas, compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias: Bernadesioideae, Cichorioideae e Asteroidea (BREMER, 2001); são amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO et al., 1991; JOLY, 1991). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies (BARROSO et al., 1991). Família com características das mais variadas possíveis, hábito herbáceo a arbóreo, às vezes trepadeira, caule geralmente subcilíndrico, não alado, às vezes alado. Folhas geralmente simples, alternadas ou opostas, às vezes rosuladas, basais ou verticiladas (HATTORI; NAKAJIMA, 2009). Sua principal característica são as flores reunidas em capítulos (BARROSO et al., 1991).

A. hispidum (Figura 1) é uma planta anual, ereta, reproduz-se por sementes, tendo um ciclo de aproximadamente 120 dias, florescendo comumente de fevereiro a abril e frutificando de março a maio (LEITÃO FILHO; ARANHA; BACCHI, 1972). A espécie pode atingir até 1m de altura (CHAKRABORTY; GAIKWAD; SINGH, 2012); tem sistema radicular ramificado, apresentando uma raiz principal que pode atingir 20 cm de comprimento (LORENZI, 2008); o caule é recoberto por pelos delgados, com folhas de sabor amargo, simples e opostas, medindo em média 6 x 3 cm, as sementes possuem tegumento escuro e opaco, relativamente espesso e resistente (LEITÃO FILHO; ARANHA; BACCHI, 1972; KISSMANN, 1978). As inflorescências são axilares, em capítulos, com pequenas flores amareladas. Os frutos são do tipo aquênio, de forma triangular, recobertos por cerdas irregulares (HOLM et al., 1997, LORENZI, 2008).

Figura 1. *Acanthospermum hispidum*, indivíduo adulto: (a) Inflorescência; (b) indivíduo; (c) raízes; (d) folhas.



3.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA

De acordo com o sistema de Cronquist (CRONQUIST, 1996), a espécie *A. hispidum* tem a seguinte posição taxonômica, representada no quadro 1.

Quadro 1. Posição taxonômica de *Acanthospermum hispidum*.

Divisão	Magnoliophyta Cronquist, Takhtajan
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Subfamília	Asteroideae
Tribo	Heliantheae
Subtribo	Helianthinae
Gênero	<i>Acanthospermum</i>
Espécie	<i>Acanthospermum hispidum</i>

Fonte: ARAÚJO, 2007.

3.3 DENOMINAÇÃO CIENTÍFICA E POPULAR

O gênero *Acanthospermum* é formado a partir da junção de duas palavras gregas, *ákanthos* (espinho) e *sperma* (semente) e refere-se à fruta espinhosa (HALL; VANDIVER; FERRELL, 1989). O epíteto *hispidum* provém do latim e significa áspero, peludo, espinhoso ou eriçado (SARAIVA, 2000). No conjunto, a classificação define uma espécie hirsuta, com sementes guarnecidas de espinhos (ARAÚJO, 2007). Acerca de *Acanthospermum hispidum*, existem inúmeras citações, as quais estão representadas nos quadros 2 e 3.

Quadro 2. Sinonímia científica de *Acanthospermum hispidum*.

SINONÍMIA	REFERÊNCIA
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC	LEITÃO-FILHO; ARANHA; BACCHI, 1972; IPA, 1997.
<i>Acanthospermum acanthioides</i> DC	COIMBRA, 1942.
<i>Acanthospermum brasiliun</i>	CORREA, 1978; CRUZ, 1964.
<i>Acanthospermum humile</i> var.	VIA RURAL, 2007.
<i>Acanthospermum humile</i> Eggers	CORREA, 1978; LORENZI, 1982.
<i>A. humile</i> (Sw.) DC.	VIA RURAL, 2007.
<i>Acanthospermum xanthioides</i>	CORREA, 1978; LECOINT, 1947.
<i>Melampodium humile</i> Sw	VIA RURAL, 2007.

Fonte: ARAÚJO, 2007.

Quadro 3. Nomes de *Acanthospermum hispidum* no Brasil.

NOMES	REFERÊNCIAS
Amor-de-negro, Benzinho, Maroto (MG); Cabeça-de-boi, Camboeiro, Mata-pasto, Picão-da-praia, Poejo-da-praia, Retirante (CE); Carrapicho-de-carneiro, Carrapicho-rasteiro (BA); Chifre-de-Carneiro, Chifre-de-veado (PR); Camboeiro, Espinho-de-agulha, Espinho-bravo, Espinho-de-carneiro, Espinho-de cigano.	LEITÃO FILHO; ARANHA;BACCHI,1972; BRAGA, 1976; BRANDÃO, 1986; COIMBRA, 1994; CORREA, 1978; COSTA, 1941; LORENZI, 1982; MATOS, 1997.

Fonte: ARAÚJO, 2007.

3.4 OCORRÊNCIA

A espécie tem sua origem atribuída à América Central e do Sul (BRAGA, 1976), é amplamente distribuída em regiões tropicais como Argentina, Venezuela, Bolívia, Paraguai, Brasil (EL KAMALI; EL KHALIFA, 1997). Provavelmente, foi introduzida na Índia e África a partir da América do Sul (NAIR et al., 1985) (SUMMERFIELD; SAALMULLERA, 1998). Nos EUA, encontra-se na Geórgia, Virgínia, Flórida, Nova Jersey e Alabama (NAIR et. al., 1985), podendo, também, ser encontrada em Nicarágua, Honduras, Hawaii e Austrália (MATHUR; BEJARANE, 1976).

3.5 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

Os primeiros estudos referentes à composição química de *Acanthospermum hispidum* evidenciaram a presença de lactonas sesquiterpênicas (HERZ; KALYANARAMA, 1975; RAMACHANDRAN et al., 1976; MARTHUR; BEJARANE, 1976).

Estudos de avaliação por cromatografia em camada delgada de amostras de extratos fluidos de *A hispidum* cultivado e de ocorrência espontânea foram realizados por Xavier e Araújo (1998) no qual foi possível observar que não há

diferenças qualitativas em seus padrões fitoquímicos. No quadro 4 estão sumarizados pesquisas fitoquímicas com *A. hispidum*.

Quadro 4. Compostos químicos relatados em *Acanthospermum hispidum*.

PARTE DA PLANTA	COMPOSTOS QUÍMICOS
Planta Inteira	<i>n</i> -butil eicosanóide (MATHUR; BEJARANE, 1976, NAIR et al., 1976).
Partes Aéreas	Lactonas sesquiterpências (BOHLMANN et al, 1979; JAKUPOVIC et al, 1986; MENUT et al., 1995; CARTAGENA et al, 2000), glicosídeos (acanthospermol- β -galactosidopiranosídeo) (RAMACHANDRANA et al, 1976;. JAKUPOV et al, 1986;. HERZ ; KALYANARAMA, 1975), monossacarídeos, dissacarídeos, polióis, glicose, frutose, sacarose (HUSSAIN et al., 1990), guianolidos hispidimolidos A e B, melampolido, alcaloide (CARTAGENA et al., 2000) e saponinas (ODEBIYI; SOFOWORA, 1978).
Raízes	Aminoácidos (ARAÚJO et al., 1989), saponinas, açúcares e polifenóis (catequinas, cumarinas, flavonas), (CAETANO et al., 1990), ésteres de ácido cafeico (XAVIER; ARAÚJO, 1998), β -sitosterol, estigmasterol (ARAÚJO, 2007).

Fonte: ARAÚJO, 2008.

3.6 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Na medicina popular são utilizadas partes aéreas, raízes e até mesmo a planta inteira (MATOS, 1997; NOVY, 1997; BARROS; NAPOLEAO, 2003). Apresenta propriedades antimalárica (SUMMERFIELD; SAALMULLERA, 1998; SANON et al., 2003), antimicrobiana (FLEISCHER; AMEADE; SAWER, 2003; EDEWOR; OLAJIRE, 2011; ADU et al., 2011), anti-helmíntica (HAREKRISHNA et al., 2010), antiviral (SUMMERFIELD et al., 1997), antineoplásica (NAIR et al., 1985; JAKUPOVIC; BARUAH; BOHLMANN, 1986; DEEPA; RAJENDRAN, 2007) antidiarreica (ABDULKARIM et al., 2005), antitripanossoma e leishmanicida (BERO et al., 2011). É utilizada no Brasil como agente abortivo (LEMONICA; ALVARENGA,

1994), antiasmático (ARAÚJO et al., 2007), antianêmico e em infecções do sistema urinário (SOUSA et al., 2011).

3.6.1 Atividade Abortiva e Teratogênica

No Brasil, extratos aquosos de *Acanthospermum hispidum* têm sido utilizados na tentativa de produzir o aborto. Segundo Lemonica e Alvarenga (1994), o tratamento de ratas grávidas, durante o período de organogênese, com extratos aquosos de *A. hispidum*, produziu um aumento no número de malformações externas, dose-dependente. Não foram observadas alterações no tempo de gestação com o tratamento, assim como malformações internas em fetos, entretanto, houve uma significativa incidência de fetos com anomalias viscerais.

3.6.2 Atividade Antibacteriana

Duas novas flavonas, 5,7,2',5'-tetra-hidroxi-3,4'-dimetoxiflavona e 5'-acetoxi-5,7,2'-tri-hidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, foram isoladas com sucesso das folhas de *A. hispidum*, ambos os compostos exibiram atividade antibacteriana frente a *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella dysenteriae*, porém inativos frente à *Escherichia coli*, *Pyogenes Corynebacterium* e *Proteus vulgaris* (EDEWOR; OLAJIRE, 2011). O estudo da atividade antimicrobiana, por Fleischer, Ameade e Sawyer (2003) em extrato bruto etanólico e frações polares de folhas e botões florais de *A. hispidum* apresentaram expressivos e variados graus de atividade antibacteriana, particularmente contra organismos Gram-positivos, entre eles, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* e *Clostridium histolyticum*, possivelmente devido à presença de alcaloides e outros compostos que parecem estar presentes em frações polares (Fração acetato de etila (Fr-EtOAc) e Fração metanólica (Fr-MeOH)) do extrato bruto etanólico, os resultados desta investigação suportam o uso tradicional das folhas e dos botões florais de *A. hispidum* no tratamento de furúnculos.

Arena e colaboradores (2011) descreveram que possivelmente a Acanthospermal B, uma lactona sesquiterpênica, presentes em extrato de *A. hispidum* seja responsável pelas propriedades antibacterianas frente às bactérias

Enterococcus faecalis e *Staphylococcus aureus*, contudo inativa frente a bactérias Gram-negativas e *Lactobacillus*.

Devido à necessidade de uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas, surgem, então, novos agentes capazes de modificar a estrutura da bactéria, a fim de obter um fenótipo permeável a um determinado antibiótico. Tais agentes podem tornar o patógeno susceptível a um antibiótico previamente ineficaz (LI et al., 1994), deste modo, foi possível observar a atividade antibacteriana em concentrações sub-inibitórias do extrato etanólico de *A. hispidum*. O extrato etanólico (5 mg/ml) aumentou a atividade da amoxicilina frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, entretanto reduziu ligeiramente a atividade contra *Klebsiella pneumoniae*. Na busca constante de fármacos, é possível encontrar fitoconstituintes em *A. hispidum* capaz de reduzir infecções causadas por bactérias (ADU et al., 2011).

3.6.3 Atividade Anti-Helmíntica

Harekrishna e colaboradores (2010) submeteram extratos clorofórmico, hidroetanólico (EtOH 70%) e éter de petróleo, das folhas de *A. hispidum* (5-25 mg/mL), juntamente com fármacos de referência (Citrato de Piperazina e Albendazol) a estudos de atividade anti-helmíntica. O extrato hidroalcoólico apresentou atividade comparável às substâncias de referência, exibiu a presença de hidratos de carbono, alcaloides, glicosídeos, flavonoides, taninos e saponinas. Provavelmente, a presença de alcaloides, glicosídeos e taninos nos extratos são responsáveis pela atividade anti-helmíntica (MARTIN, 1997). Os possíveis mecanismos de ação devem-se à presença de taninos, que interferem na geração de energia, inibindo a fosforilação oxidativa e também, devido a presença de alcaloides que atuam sobre o sistema nervoso central, causando paralisia em helmintos (HAREKRISHNA et al., 2010).

3.6.4 Atividade Antiviral

Summerfield e colaboradores (1997) investigaram a atividade antiviral do extrato aquoso das folhas de *A. hispidum* e puderam observar a inibição da

replicação do vírus alfa-herpes, pseudorraiva (PrV) e herpesvírus bovino tipo1 (BoHV-1).

3.6.5 Atividade Antitumoral

Mothana e colaboradores (2009) submeteram o extrato metanólico de folhas de *Acanthospermum hispidum* a ensaio em microplacas de cultura, utilizando três linhagens de células de cancer: pulmão (A-427), bexiga (5637) e mama (MCF-7), no qual foi possível observar que estes extratos apresentaram efeitos citotóxicos em todas as linhagens estudadas. O extrato etanólico 50% (EtOH/H₂O) e frações polares (Fr-EtOAc) exibiram atividade antitumoral em camundongos semelhantes ao 5-fluorouracil (DEEPA; RAJENDRAN, 2007).

3.6.6 Atividade Antitripanossoma

Bero e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de extratos de diclorometano das partes aéreas de *A. hispidum*, no qual constataram a inibição do crescimento de *Trypanosoma brucei* (estirpe 427).

3.6.7 Atividade Antidiarreica

Abdulkarim e colaboradores (2005) investigaram a atividade antidiarreica do extrato metanólico das partes aéreas de *A. hispidum* em coelhos, e foi possível verificar o efeito dose-depedente (0,5-1,0 mg/mL) no intestino delgado de coelhos. Em baixas doses (0,5-1,0 mg/mL) dos extratos, foi evidenciado relaxamento do músculo liso, entretanto, utilizando altas doses do extrato (2,0-3,0 mg/mL) não houve aumento proporcional no efeito do relaxamento do músculo liso no intestino delgado dos coelhos.

3.6.8 Atividade Antimalárica

Ensaio realizados por Sanon e colaboradores (2003) sugerem que a atividade antimalárica de caule e folhas de *A. hispidum* provém de alcaloides presentes em seus extratos. O extrato foi avaliado *in vitro* contra dois clones de

referência de *Plasmodium falciparum*: cepas W2 cloroquina-resistentes e D6 cloroquina-sensíveis, no qual foi verificada atividade inibitória significativa (IC₅₀ = 5,02ug/mL).

3.6.9 Atividade Antiasmática

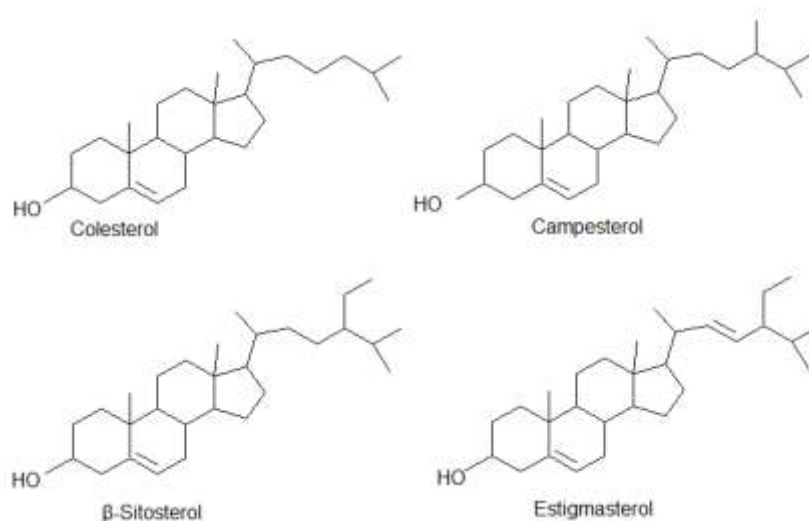
Acanthospermum hispidum tem sido tradicionalmente utilizada no Nordeste do Brasil no tratamento de asma e bronquite (MORAIS et al., 2005; TORRES et al., 2005; AGRA; FRANCA; BARBOSA-FILHO, 2007), Araújo (2007) sugere que os fitosteróis, presentes no xarope de raízes de *A. hispidum*, são os responsáveis por sua atividade antiasmática.

Recentemente, programas de saúde pública demonstraram resultados obtidos no tratamento de pacientes bronco-asmáticas com xaropes preparados a partir de extratos hidroetanólicos de raízes de *A. hispidum* (ARAÚJO, 2007). Estudos clínicos realizados por Maciel e colaboradores (1997), em um grupo de pacientes pneumopatas, portadores de doenças pulmonares obstrutivas (DPOC), comprovaram a eficácia do efeito bronco-dilatador do xarope.

3.7 FITOSTERÓIS

Os fitosteróis são, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos (LAW, 2000). Portanto, são substâncias esteroidais ou terpenoides tetracíclicos extraídos de espécies vegetais. Embora Law (2000) tenha citado a existência de cerca de 40 fitoesteróis, mais de 250 fitosteróis e compostos relacionados têm sido descritos na literatura (BRUFAU et al., 2008). Os fitosteróis mais encontrados na natureza são β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Figura 2) (JONES; RAEINI-SARJAZ; NTANIOS, 2000).

Figura 2. Estrutura química do colesterol e principais fitosteróis.

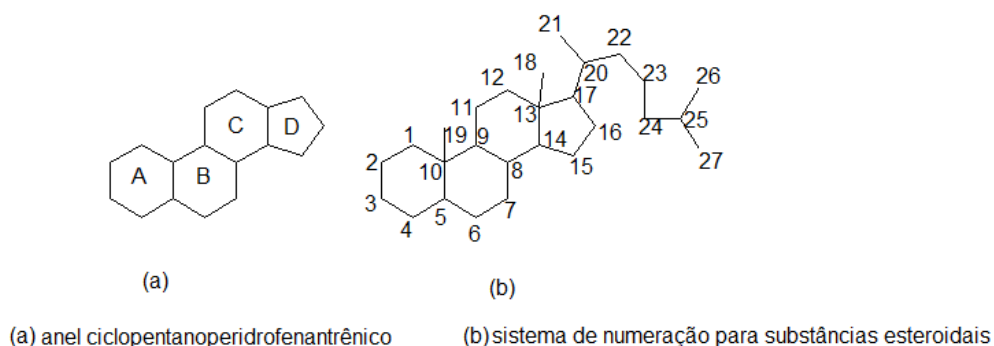


Fonte: OLIVEIRA, 2007.

Os fitosteróis, quimicamente, são álcoois constituídos por 28 ou 29 átomos de carbono, semelhantes ao colesterol, um álcool de 27 átomos de carbono, cujas modificações envolvem a cadeia lateral e incluem a adição de ligações insaturadas e/ou grupamentos metila ou etila (AWAD; FINK, 2000; NORMÉN et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

O núcleo fundamental das substâncias esteroidais (Figura 3) é constituído pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico ligado a dois grupamentos metila nas posições C-10 e C-13, e a cadeia lateral na posição C-17 apresenta número de átomos de carbono variável entre dois e oito.

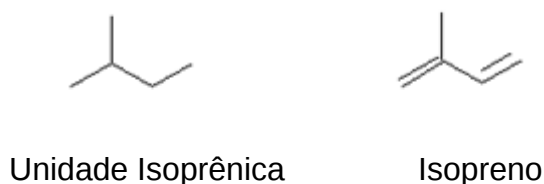
Figura 3. Núcleo esteroidal de substâncias esteroidais.



Fonte: OLIVEIRA, 2007.

Os fitosteróis formam uma importante família de metabólitos, devido suas atividades farmacológicas, sendo o isopreno a estrutura básica para a formação destes compostos através da unidade básica de cinco carbonos, a unidade isoprênica (C5) (Figura 4) (DEWICK, 1997).

Figura 4. Unidade básica de formação de fitosteróis.



Fonte: DEWICK, 1997.

Os esteroides são sintetizados no citosol a partir do acetil-CoA em uma série complexa de reações e com a participação de intermediários como β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, mevalonato e dois isoprenos ativados, o dimetilalil-pirofosfato e o isopentenil-pirofosfato. A condensação de unidades de isopreno produz o esqualeno, que, sendo não cíclico, é ciclizado para liberar o anel esteroide e sua cadeia lateral (LEHNINGER; NELSON, COX, 1995; DEWICK, 1997).

O início do processo se dá com a reação de condensação de unidades de acetato, formando mevalonato e a unidade isoprênica (3-metil-3-butenil-pirofosfato ou isopentenil-pirofosfato) (LEHNINGER; NELSON, COX, 1995).

A unidade isoprênica formada isomeriza-se, resultando em uma mistura de 3-metil-3-butenil-pirofosfato e 3-metil-2-butenil-pirofosfato (ou dimetilalil pirofosfato) no estado de equilíbrio químico, e estes dois compostos condensam-se para formar geranyl-pirofosfato (composto por dez átomos de carbono), o qual subsequentemente condensa-se com 3-metil-3-butenil-pirofosfato, gerando farnesil-pirofosfato (composto por quinze átomos de carbono). Duas moléculas de farnesil-pirofosfato, por sua vez, sofrem condensação redutiva, formando esqualeno, o precursor direto dos esteroides, que sofre então oxidação para o fechamento dos anéis e a formação do núcleo ciclopentanoperidrofenantrenico (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995; SOLOMONS; FRYHLE, 1998; SARKER; NAHAR, 2007).

A fusão dos anéis a partir do esqualeno permite a formação de um grande número de possíveis isômeros. A estereoquímica dos esteroides é dependente da conformação do sistema de anéis ciclopentanoperidrofenantreno.

A nomenclatura esterol é aplicada especificamente para álcoois que apresentam o referido núcleo fundamental, para tanto, praticamente todos os fitosteróis apresentam um grupamento hidroxila na posição C-3 (ROBINSON, 1991).

As substâncias esteroidais presentes em vegetais frequentemente ocorrem em sua forma não livre, ou seja, como derivados mais complexos, como glicosídeos ou ésteres com ácidos graxos ou aromáticos (ROBINSON, 1991).

Os fitosteróis são sujeitos à oxidação quando expostos ao ar, semelhantemente ao colesterol, tendo em vista a semelhança estrutural, em especial a dupla ligação entre C-5 e C-6, tendo como produto final o derivado 7-ceto (BERGSTRÖM; WINTERSTEINER, 1942). A oxidação dos mesmos pode ser aumentada pelo calor, radiação ionizante, exposição à luz ou por catalisadores químicos (SÄYNÄJOKI et al., 2003).

Este grupo de substâncias está presente nas membranas celulares de espécies vegetais superiores, assumindo uma grande variedade de atividades biológicas específicas, em adição aos seus papéis como constituintes na bicamada lipídica, os fitosteróis são encontrados no desenvolvimento de plastídios em cloroplastos, participando do transporte intracelular (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Segundo Saelens e colaboradores (2004) os fitosteróis atuam inibindo significativamente o crescimento de células tumorais, o mesmo é um agente promotor de apoptose eficaz, sua incorporação na dieta pode servir de medida preventiva para o câncer de mama (MESSINA; BARNES, 1991; CHO et al., 2003) e próstata (AWAD et al., 2001, 2004; AWAD; FINK, 2000).

Araújo (2007) isolou o β -sitosterol, um fitosterol que difere estruturalmente do colesterol apenas no substituinte etila no átomo de carbono C24 da cadeia lateral (OVESNÁ et al., 2004), de raízes de *A. hispidum*, evidenciou que presença da substância esteroideal justificaria a significativa ação do extrato bruto de *A. hispidum* quando comparada com outro esteroide (dexametasona) em estudo de ação anti-inflamatória em lavado alveolar de ratos.

Diversas ferramentas analíticas foram relatadas na literatura para quantificar fitosteróis, principalmente por CLAE (acoplado a UV e/ou detector de EM) e/ou CG (FID acoplado a e/ou detector de EM) (ABIDI, 2001; LEMBCKE et al, 2005; LIU; RUAN, 2013; LAGARDA et al, 2006). Apesar das vantagens das ferramentas, como seletividade e sensibilidade, a quantificação dos fitosteróis por CLAE ou GC tem

mostrado algumas limitações, tais como a detecção (por UV e/ou detector FID), o custo operacional elevado (detector EM), na preparação da amostra ou na derivatização (KUKSIS, 2001; BURKARD et al, 2004), como alternativa para esse problema, seria a inserção de um método enzimático para determinação de esteróis, entretanto, o mesmo não foi considerado um método específico (SHEN; CHEN; SHEPPARD, 1982; NOGUEIRA; BRAGAGNOLO, 1998).

Vários ensaios colorimétricos foram propostos para identificação e quantificação de compostos esteroidais através da utilização do reagente Liebermann-Burchard (FERRO; HAM, 1960; BARTOS; PESEZ, 1976; XIONG et al., 2002; KUMAR, SINGH; SINGH, 2011), ácido *p*-toluenossulfônico (PEARSON et al, 1952) e cloreto férrico (ZLATKIS; ZAK; BOYLE; 1953, MACLINTYRE; RALSTON, 1954). No entanto, a reação descrita por Liebermann em 1885 e pouco depois, aplicada à análise do colesterol por Burchard, é o processo amplamente utilizado para análise de esteróis (LIEBERMANN, 1885; BURCHARD, 1890; BURKE et al., 1974; XIONG et al., 2002; STUDER et al., 2003). Inicialmente proposto para determinações clínicas de colesterol, o método a partir da reação Liebermann-Burchard é utilizado para análise satisfatória dos esteróis em animais e plantas, (XIONG et al., 2002), assim como, a determinação por espectrofotometria UV/Vis é um método amplamente utilizado para quantificação devido à sua simplicidade, baixo custo de implementação e disponibilidade em laboratórios de controle de qualidade (KOMAROVA et al., 2009; SILVA et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; MARQUES et al., 2013).

CAPÍTULO II

Controle de qualidade de raízes de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae)

4.1 Controle de qualidade de raízes de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae)

RESUMO

A qualidade dos fitoterápicos inclui rigoroso acompanhamento das diferentes etapas do desenvolvimento e produção, desde a coleta do vegetal até a disponibilidade do produto final. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade da raiz de *Acanthospermum hispidum* (Espinho-de-cigano), uma vez que a espécie é amplamente utilizada pela população no tratamento da asma, porém não consta em códigos oficiais, contribuindo assim, com dados para o controle de qualidade. Foi realizada triagem fitoquímica preliminar para verificar a presença de fitosteróis e caracterização físico-química em raízes de *A. hispidum*. Para o controle físico-químico, utilizaram-se metodologias farmacopeicas. Os resultados obtidos demonstraram que as raízes apresentam um teor de umidade de $9,51\% \pm 0,07$ (0,73%). Para a determinação de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, os valores obtidos foram $4,66\% \pm 0,08$ (1,71%) e $0,15\% \pm 0,005$ (3,27%), respectivamente. Para o teor de extrativos o valor médio encontrado foi $4,72 \pm 0,153$ (3,24%). De acordo com a distribuição granulométrica, a amostra foi classificada como pó moderadamente grosso com tamanho de partícula 560 μm . Com a triagem fitoquímica por CCD, foi possível confirmar presença de fitosteróis, sugerindo a adequação destes compostos como marcadores químicos para o controle de qualidade da espécie. Assim, os resultados obtidos podem ser utilizados como parâmetros no controle de qualidade de matérias-primas para este fitoterápico.

Palavras chaves: *Acanthospermum hispidum*. Fitosteróis. Controle físico-químico

ABSTRACT

The quality of herbal products includes a accurate monitoring of different stages of development and production, from the collection of the vegetable to the availability of the final product. So, the objective of this study was to evaluate the quality of *Acanthospermum hispidum* (Thorn-of-gypsy) root, since the species is widely used by people in asthma treatment and it isn't yet include in official codes, thus contributing with data for quality control. A preliminary analysis was performed in order to verify the presence of phytosterols physico-chemical characterization in roots of *A. hispidum*.methodos Pharmacopeic were used to physico-chemical control. The results showed that roots have a moisture content of $9.51\% \pm 0.07$ (0.73%). For the determination of total ash and ash insoluble in acid, the values obtained were $4.66\% \pm 0.08$ (1.71%) e $0.15\% \pm 0.005$ (3.27%), respectively. For determination of dry residue values were obtained 4.72 ± 0.153 (3.24%). According to the grain size distribution, the sample was rated as moderately coarse powder (560 μm). The presence of phytosterols was confirmad by TLC analysis using comparative analysis between Rfs from staining spots in the sample and the standard profile. Thus, the results obtained may be used as parameters in quality control of the raw materials for this herbal medicine.

Key-words: *Acanthospermum hispidum*. Phytosterols. Physico-chemical properties, quality

INTRODUÇÃO

Desde os anos 80, observou-se em todo o mundo o que se convencionou chamar de “Onda Verde”, ou seja, o retorno da população à utilização de medicamentos a base de extratos vegetais para dirimir, “de forma mais saudável”, seus problemas de saúde (LEITE, 2009). Essa tendência pode ser explicada por diversos fatores, destacando-se, entre eles, o custo elevado de medicamentos alopáticos, a preferência dos consumidores por “produtos naturais”, o desenvolvimento de novas formas de preparação e administração de produtos fitoterápicos, melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das matérias-primas vegetais e seus derivados (CANIGUERAL et al., 2003; DI STASI, 1996; VIEIRA, 2001).

Apesar dessa situação que se instalou na área farmacêutica, no Brasil houve pouca evolução em relação à qualidade do fitoterápico (FONSECA; LIBRANDI, 2008; ALVARENGA et al., 2009; BORELLA; CARVALHO, 2011), mesmo com a publicação de diversas legislações (BRASIL, 2008; BRASIL, 2010) e do Formulário de Fitoterápicos (2010), atualizando as técnicas de preparo de algumas formas farmacêuticas (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996).

Para atestar a qualidade das drogas e seus derivados, este processo tem início na identificação correta da espécie, etapa não menos importante do que o seu plantio, colheita e estabilização. Isto se estende também no modo de preparo dos extratos vegetais e medicamentos, diversos fatores influenciam a qualidade final, tais como: variações climáticas, tipo de solo empregado no plantio, época da colheita, características genéticas da planta, condições de secagem, tempo de armazenamento, entre outros. Porém, é necessário obedecer aos parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos, que são, em princípio, estabelecidos nas Farmacopeias e Códigos Oficiais (BRASIL, 2010). No caso das matérias-primas vegetais oriundas de plantas clássicas, existem monografias definindo critérios de identidade, pureza e teor de constituintes químicos (BARNI et al., 2009; MICHELIN et al., 2010).

Considerando trabalhos relatados para a espécie *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae) em ensaios investigativos farmacológicos e fitoquímicos que confirmam o potencial medicinal dessa planta (SANON et al., 2003; ARAÚJO et al., 2007a, HAREKRISHNA et al., 2010; ADU et al., 2011; BERO et al., 2011; EDEWOR;

OLAJIRE, 2011), o presente estudo propõe investigação fitoquímica preliminar para avaliar a presença de fitosteróis e caracterização físico-química em raízes de *A. hispidum*.

METODOLOGIA

Matéria-Prima Vegetal

A matéria-prima vegetal *Acanthospermum hispidum* foi coletada no canteiro de cultivo de plantas medicinais do Laboratório de Fitoterapia da Prefeitura Municipal de Olinda (PE) (Latitude: -8,0131; Longitude: -34,8617) no ano de 2011.. A exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, da empresa Pernambucana de Pesquisa Agronômica (IPA), sob o número 73350. A matéria-prima vegetal foi seca à sombra e submetida à moagem em moinho de facas tipo Willey (Adamo®).

Reagentes e Substância de Referência

Os solventes utilizados foram todos de grau analítico: Anidrido Acético PA (FMaia®), Ácido Sulfúrico (FMaia®), Etanol (Cinética®). Foi utilizado como padrão o β -Sitosterol (Sigma-Aldrich®).

Reagente Liebermann-Burchard

Para a preparação do reagente Liebermann-Burchard, foram transferidos 50,0 mL de anidrido acético para um frasco âmbar e mantido em banho de gelo. Após 30 minutos em repouso, foram adicionados 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. (KENNY, 1952).

CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Os testes de determinação de perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de cinzas insolúveis em ácido, teor de extrativos e granulometria foram realizados em raízes de *A. hispidum*, segundo Farmacopeia Brasileira 5ª edição

(2010). Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em média, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Teor de Umidade

O teor de umidade foi avaliado através da determinação da perda por dessecação. Três amostras de droga vegetal moída (2,0 g), foram transferidas para pesa-filtros previamente tarados e mantidas em estufa a 105°C por duas horas. Após resfriamento por 30 minutos em dessecador provido de sílica, os pesa-filtros foram pesados e novamente colocados na estufa, por mais uma hora, repetindo-se o processo até peso constante. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual de acordo com a equação 1 (FB5, 2010).

$$\text{Teor de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

P_a = peso da amostra;

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

Determinação de Cinzas Totais

Cerca de 3,0 gramas de matéria-prima vegetal, foram transferidos para cadinhos de silício, previamente tarados. As amostras foram distribuídas uniformemente no cadinho e incineradas a uma temperatura de $600 \pm 25^\circ\text{C}$, até que todo o carvão fosse eliminado. Após resfriamento por 30 minutos, em dessecador provido de sílica, os cadinhos foram pesados. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à matéria-prima vegetal seca ao ar (FB5, 2010).

Determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido

Para determinação de cinzas insolúveis em ácido, o resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25,0 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi

lavado com 5,0 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro isento de cinza, e lavado com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original e incinerado ($\pm 500^{\circ}\text{C}$) até peso constante. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à matéria-prima vegetal seca ao ar (FB5, 2010).

Teor de Extrativos

Amostras contendo 1,0 g de raízes de *Acanthospermum hispidum* foram submetidas à decocção com 100,0 mL de água, durante 10 minutos. Após arrefecimento, os volumes foram completados para 100,0 mL e as soluções foram filtradas, desprezando-se os 20,0 mL iniciais. Com auxílio de pipeta volumétrica, 20,0 mL do filtrado foram colocados em pesa-filtros (previamente pesados e dessecados) e levados à evaporação até secura do líquido em banho-maria. Em seguida, as amostras foram levadas a estufa por 2 horas, a 105°C , resfriadas em dessecador por 30 minutos e pesadas. O procedimento foi realizado até obter peso constante. O resultado foi expresso pela média das pesagens e o teor de extrativos foi determinado através da equação 2 (FB5, 2010).

$$\text{Teor de extrativos (\%)} = \frac{g \cdot \text{FD} \cdot 500}{m} \quad (2)$$

Onde: g = massa do resíduo seco (g); FD = fator de diluição e m = massa da amostra inicial (g).

Análise Granulométrica por tamização

Três amostras contendo 25,0 g de raízes de *A. hispidum*, previamente moídas em moinho de facas, foram submetidas à determinação da granulometria com o auxílio de tamises, operados por dispositivo mecânico. Foram separados, de acordo com as características da amostra, 4 tamises de números 20, 40, 60 e 100, com

aberturas de malha correspondentes a 850, 425, 250 e 150 μm , respectivamente. O conjunto foi montado sobre o equipamento, com o tamis de maior abertura sobre o de menor abertura. A amostra foi transferida para o tamis superior, distribuída uniformemente. Após 15 minutos de vibração mecânica, utilizando um pincel adequado, a amostra foi removida da superfície superior de cada malha para um papel impermeável e pesada. O percentual retido em cada tamis foi calculado a partir da equação 3 (FB5, 2010).

$$\% \text{Retido do Tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (3)$$

Onde: P1 = peso da amostra retida em cada tamis (em gramas), e P2 = soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas).

Caracterização Fitoquímica de Fitosteróis

O extrato hidroetanólico foi preparado empregando-se raízes pulverizadas (20,0 g), através de maceração durante 7 dias em temperatura ambiente e utilizando-se etanol 70% (v/v) como solvente. Após filtração, amostras do extrato foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação da presença de fitosteróis. A amostra foi aplicada em placa de sílica gel 60 F254 (Merck, Alemanha), utilizando como eluente tolueno: acetato de etila (90:10). Após eluição, a cromatoplaça foi revelada com o reagente Liebermann-Burchard e observada sob luz natural. Como padrão, foi empregado o β -sitosterol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de Umidade

A perda por dessecação expressa o percentual da umidade residual da matéria-prima vegetal. O teor de umidade apresentou valor médio de $9,51\% \pm 0,07$ (0,73%). O resultado obtido apresentou-se satisfatório, não ultrapassando o teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias, que varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas nas monografias (FARIAS, 2003). O

excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias (COUTO et al., 2009).

Determinação de Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais envolve tanto da cinza fisiológica quanto não fisiológica e consiste em medir a quantidade do resíduo não volatilizado após calcinação da matéria-prima vegetal (SHARAPIN, 2000). O percentual encontrado foi de $4,66\% \pm 0,08$ (1,71%), sugerindo que não há presença significativa de impurezas inorgânicas não voláteis, que possa vir contaminar a matéria-prima vegetal (FB5, 2010; SONAGLIO et al., 2003).

Determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido

A determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico revelou um percentual de $0,1525\% \pm 0,005$ (3,27%). A determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico destina-se à detecção de sílica e constituintes silicosos que em quantidade acima da estabelecida para a matéria-prima vegetal indica contaminação por excesso de terra ou areia (FARIAS, 2003). Através de análise dos resultados, e de acordo com Araújo (2007b), foi possível observar que a amostra possui quantidade inferior de sílica e materiais silicosos, o que confere o grau de pureza da matéria-prima vegetal.

Teor de extrativos

O teor de extrativos indica a presença de compostos hidrossolúveis presentes no material vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens (BARNI et al., 2009). Embora não existam especificações oficiais deste parâmetro, os teores apresentados, $4,72 \pm 0,153$ (3,24%), tornam-se importantes no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para raízes de *Acanthospermum hispidum*.

Análise Granulométrica por tamização

A distribuição granulométrica de matérias-primas vegetais pulverizadas constitui um fator determinante na homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Os resultados representados em histograma de distribuição granulométrica das raízes de *A. hispidum* (Figura 1) demonstram que as partículas da matéria-prima vegetal encontraram-se predominantemente distribuídas entre os tamises 850 e 450 μm , representando respectivamente 18,46% e 46,93%.

O tamanho das partículas determinado pelo ponto de interseção das curvas de retenção e passagem está representado na figura 2. De acordo com a distribuição granulométrica, a amostra foi classificada com predominância de pós moderadamente grossos, conforme especificações da Farmacopeia Brasileira 5^a Ed. (2010). Pós de tamanho maior, como os desta classificação, favorecem as extrações, pois partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impeça a penetração de solventes.

Figura 1. Resultados de distribuição granulométrica das raízes de *A. hispidum*.

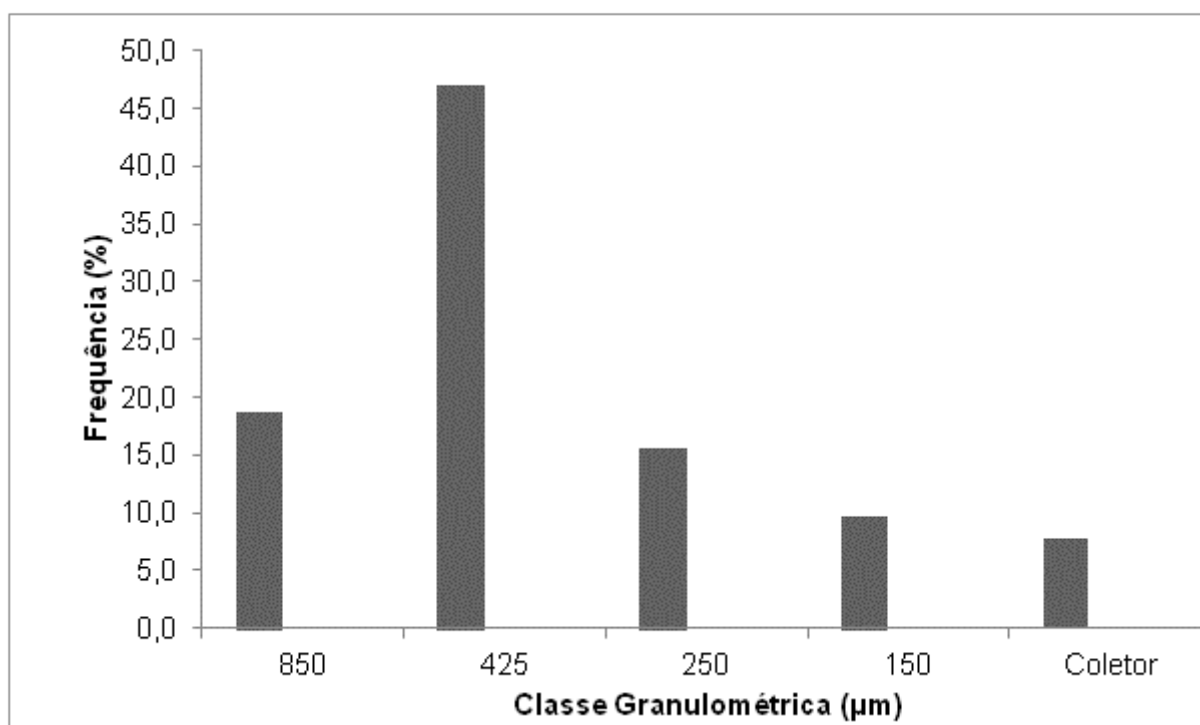
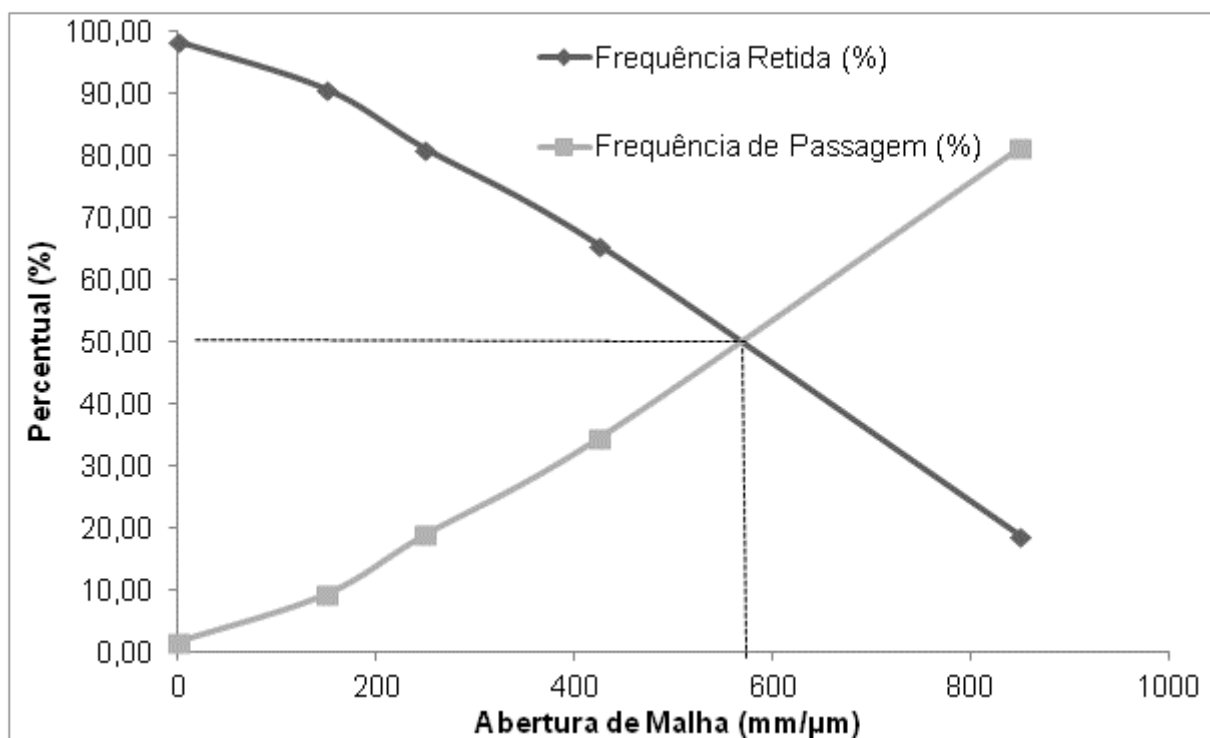


Figura 2. Curvas de retenção e passagem das raízes de *A. hispidum*.



Caracterização de Fitosteróis

A cromatografia em camada delgada é uma técnica qualitativa simples, pouco dispendiosa e rápida (WADA, 1987; BAKER; POKLIS, 1999; CARDOSO et al., 2001). A análise de drogas vegetais por CCD nos permite obter um perfil "fingerprint" da amostra e comparar com o perfil de uma droga padrão (β -sitosterol). Acerca da prospecção fitoquímica para caracterização de fitosteróis em raízes de *Acanthospermum hispidum* em extrato hidroetanólico, foi possível observar resultados positivos, mostrando banda semelhante na mesma posição daquela produzida pelo padrão, apresentando $R_f = 0,3$ (Figura 3). Deste modo a CCD mostrou ser uma técnica adequada para análise qualitativa de fitosteróis.

Figura 3. Cromatograma de extrato hidroetanólico de *Acanthospermum hispidum*.



Placa de Gel de Sílica F254
Eluente: tolueno:acetato de etila (90:10, v/v).
Revelador: Liebermann-Burchard
1: Padrão β -sitosterol
2: Amostra

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos tornaram-se, portanto, importantes no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para as raízes de *A. hispidum*, sobretudo pela ausência de limites estabelecidos para ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos, teor de cinzas para esta droga-vegetal. A presença de fitosteróis no extrato foi confirmada através de CCD, por comparação entre Rfs da amostra e padrão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFPE (PIBIC/UFPE), a FACEPE (APQ-1296-12) e ao CNPQ (312537/2009-3, 501834/2010-9, 475216/2011-3, 483870/2011-0) pela concessão de bolsas e pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ADU, F.; GBEDEMA, S.Y.; AKANWARIWIAK, W. G.; ANNAN, K.; BOAMAH, V.E. The effects of *Acanthospermum hispidum* extract on the Antibacterial activity of

Amoxicillin and Ciprofloxacin. **Hygeia. Journal for Drugs and Medicines**, v.3 ,n.1, p. 58- 63, 2011.

ALVARENGA, F.C.R.; GARCIA, E.F.; BASTOS, E.M.A.F.; GRANDI, T.S.M. DUARTE, M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.442-448,2009.

ARAÚJO, E.L. ***Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) Validação para fins Farmacêuticos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 116 f. 2007 a.

ARAÚJO, E.L.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; FERREIRA, C.P.; MENDONÇA R.M. Padronização farmacognóstica das raízes de *Acanthospermum hispidum* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.88, n4, p. 159-162, 2007b.

BAKER, R.C.; POKLIS, A. Forensic toxicology: a broad overview of general principles. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; SYVERSEN, T. (Eds). **General and applied toxicology**. 2.ed. London: Macmillan, v.3, p.1489-1507, 1999.

BARNI, S.T.; CECHINEL-FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., *Convolvulaceae*, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.4, p.865-70, 2009.

BERO, J.; HANNAERT, V.; CHATAIGNÉ, G.;HÉRENT. M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.998-1002, 2011.

BORELLA, J.C.; CARVALHO, D.M.A. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.92, p.11-16. 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **R. E, nº 899, de 29 de maio de 2003** – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.

BRASIL. Resolução RDC 95/2008, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Resolução RDC 14/2010 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. 5 de abril de 2010.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.L. Plantas medicinales y Fitoterapia: indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farm. Bonaer.**, v.22, p.265-278, 2003.

CARDOSO, M.F.E.C.; COSTA, V.B.S.; DIAS, M.B. et al. Laboratório. In: ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D. (Eds.). **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, p.323-328, 2001.

COUTO, R.O.; VALGAS, A.B.; BARA M.T.F.; PAULA J.R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Rev Eletr Farm.** v.6, n. 3, p.59-69, 2009.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: **UNESP**, p. 230, 1996.

EDEWOR, T. I.; OLAJIRE, A. A. Two Flavones from *Acanthospermum hispidum* DC and their antibacterial activity. International. **Journal of Organic Chemistry**, v.1, n. 3, p. 132-141, 2011.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL EP, GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003. Cap.12 p. 263-288.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: **Atheneu**. 2010.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**,v.44,p.271-277. 2008.

Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [internet] 2010. [cited 2011 dez 23]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf.

HAREKRISHNA, R.; ANUP, C.; SATYABRATA, B.; BHABANI S. N.; SRUTI RANJAN, M.; ELLAIAH, P. Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2, n.5, p. 217-221, 2010.

KENNY, A.P. The Determination of Cholesterol by the Liebermann-Burchard. **Reaction Clinical Laboratorie** v.52, p.611-619, 1952.

LEITE, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: **Atheneu**, p. 328, 2009.

MICHELIN, D.C.; FINATI, S.C.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.18-22, 2010.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. Plantas medicinais: guia para profissional de saúde. São Paulo: **Premier**, p. 296, 1996.

ICH. **Harmonised Tripartie Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 1996.

SANON, S.; AZAS, N.; GASQUET, M.; OLLIVIER, E.; MAHIOU, V.; BARRO, N.; CUZIN-OUATTARA, N.; TRAORE, A.S.; ESPOSITO, F.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. Antiplasmodial activity of alkaloid extracts 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.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnología de produtos fitoterápicos**. Bogotá: Ed. Roberto Pinzón S. 2000.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL EP, GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

VIEIRA, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Meio Ambient. Saúde**, v.2, p.57- 64, 2001.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

WADA, C.S. **Técnicas de laboratório**. 3.ed. São Paulo: Livraria Atheneu, p.511, 1987.

CAPÍTULO III

Manuscrito I: Quantificação de fitosteróis totais em raízes de *Acanthospermum hispidum* DC por UV-VIS

Artigo submetido à Revista Química Nova.

5.1 Total Phytosterol Content in Drug Material and Extractives from Roots of *Acanthospermum hispidum* DC. by UV-VIS spectrophotometry

Larissa B.D. Araújo¹, Sarah L. Silva², Marcos A.M. Galvão², Magda R.A. Ferreira¹, Evani L. Araújo³, Karina P. Randau^{1,2}, Luiz A. L. Soares^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPE

²Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

³Faculdade Pernambucana de Saúde – IMIP

Abstract

Acanthospermum hispidum DC. is widely used by the popular medicine in Brazil against respiratory diseases and this biological property have been attributing to its phytosterols content. Thus, the aim of this study was to evaluate a spectrophotometric assay in order to quantify the total phytosterol content in raw material and extractives from roots of *A. hispidum*. The procedure was ground on the quantification at 625 nm after Liebermann-Burchard reaction. The methods were evaluate by linearity, repeatability, intermediate precision, accuracy and robustness. The data denoted the procedure as valid analytical tool of herbal material and derivatives from *A. hispidum*.

Keywords: *Acantospermum hispidum*. Total phytosterol content. UV-VIS.

INTRODUCTION

The species *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae) has aroused interest in studies of biological activities, due to popular use in Brazil and around the world ^{1, 2, 3}. In Northeast of Brazil, the species has been traditionally used as treatment of asthma, bronchitis and expectorant ^{4, 5}. Data on usage of *A. hispidum* syrup in herbal medicine program in the public health service have showed promising results in treating patients with bronchial asthma ^{1,6}. Considering the significant phytosterols content in herbal drug and the reports on literature about biological properties of these substances, it is believed that they are related to therapeutic potential ⁶. In spite of the pharmacological potential and great interest by the scientific community, the species does not appear in official monographs and it does not present specifications and/or analytical procedures for the quality control. In this way, the development and validation of an analytical method applied to *A. hispidum* herbal drug appear as an important precondition to the establishment of quality parameters that guide its quality, therapeutic efficacy and security ^{7, 8}.

Regarding the quantification of phytosterols in herbal material, several analytical tools were reported in the literature, mainly by HPLC (coupled to UV and/or MS detector) and/or GC (coupled to FID and/or MS detector) ^{9, 10, 11, 12}. In spite of the advantages of such tools as selectivity and sensitivity, the quantification of phytosterols by HPLC or GC show some limitations such as detection (either by UV and/or DAD detector), high operational cost (MS detector) or several steps on the sample preparation or derivatization ^{13, 14}.

Additionally, the quantification a set of compounds or isolated compounds in biological matrices such as herbal materials by the using of selective procedures is a very controversial point in the analysis and quality control. Since the pharmacological activity from herbal drugs or phytopharmaceuticals is a result of joint action of a group of substances, unlike synthetic or purified drugs ¹⁵.

On the other hand, analytical methodologies by UV/VIS spectrophotometry are the most widely used tools for chemical quality control of herbal materials, due to their simplicity, low cost of implementation and reproducibility ^{16, 17, 18, 19}.

In this way, several colorimetric assays were proposed for identification and quantification of sterols derivatives ^{20, 21}. However, the reaction described by Liebermann in 1885 and applied to cholesterol analysis shortly after by Burchard, is

the most widely used colorimetric procedure for sterols analysis^{22, 23, 24}. Proposed initially to clinical determinations of cholesterol, the Liebermann-Burchard reaction has been also satisfactory used to qualitative and quantitative analysis of sterols from animal and plant matrixes²⁵.

Regarding the relevance of phytosterols to several biological properties of drug materials, the aim of this study was to evaluate the performance of a spectrophotometric assay after Liebermann-Buchard reaction applied to quantify the total phytosterol content from herbal drug and hydroethanolic extract from roots of *A. hispidum*.

EXPERIMENTAL

Plant material

The roots of *Acanthospermum Hispidum* were collected in Olinda (Pernambuco, Brazil). The raw material was identified by Dr. Evani L. Araújo and a voucher specimen was deposited at the Herbarium Dárdano de Andrade Lima at Instituto Agrônômico de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil), under the registration number 73350.

Reagents and Reference Substance

All solvents used were analytical grade: Chloroform (FMaia® and Quimex®), Acetic Anhydride PA (FMaia®), Sulphuric Acid (FMaia®), and Ethanol (Cinética®). β -Sitosterol (Sigma-Aldrich®) was used as standard.

Liebermann-Burchard Reagent (LB)

Thus, 50.0 mL of acetic anhydride were transferred to an amber glass bottle and kept in ice bath. After 30 minutes 5.0 mL of sulphuric acid were carefully added to the acetic anhydride²⁶.

Hydroethanolic extract

The extractive solution was prepared by maceration for seven days, using ethanol 70 % (v/v) as solvent extractor and drug:solvent proportion of 2:10 (w/v).

Method Development

The specifications of the samples preparation, experimental conditions for analysis as well as the spectrophotometric adjustments are described in the following items.

Samples preparation

Herbal drug

The herbal drug was prepared by reflux using chloroform as solvent. The extraction was performed in a round-bottomed flask containing 6.25 g of drug material and 30.0 mL of chloroform during 30 minutes. The extract was cooled to room temperature (25° C) and filtered on cotton, and the residue (cotton and plant material) re-extracted twice, using 30.0 mL of chloroform during 15 minutes. The filtered fractions were collected in extractive solution was dried under reduced pressure at 40 ° C. The residue was resuspended in 20.0 mL of chloroform and the volume adjusted to 50.0 mL with the same solvent.

Hydroethanolic extract

About 100.0 mL of extractive solution was dried under reduced pressure at 40 ° C. The residue was resuspended in 20.0 mL of chloroform and the volume adjusted to 50.0 mL with the same solvent.

Analytical sample preparation

Aliquots of the sample (drug material or hydroethanolic extract) were transferred to 10.0 mL volumetric flasks and added of 2.0 mL from LB reagent. The volume was adjusted with chloroform. The absorptions were measured in an UV/Vis

spectrophotometer (Evolution 60S, Thermo Scientific®, Germany), 5 minutes after addition of LB reagent. Chloroform was used as blank.

Selection wavelength and sample concentration

Aliquots of the samples were subjected to scanning spectrophotometer in the region 400-900 nm, 5 minutes after adding reagent and measured using chloroform as blank. The spectra were used to identify the most appropriate dilutions and choosing the wavelength of absorption maxima of occurrence.

Reaction time

The influence of reaction time on the method responses for both samples and standard was studied by performing a reaction kinetic. For this purpose, after addition of LB reagent, the absorbance were measured each 5 minutes until 1 hour of analysis.

Liebermann-Burchard reagent optimization

The samples were prepared according to described previously and transferred to 10.0 mL volumetric flasks. Thus, different aliquots of LB reagent (1.0, 2.0 and 3.0 mL) were added and the volume was adjusted with chloroform. After 5 minutes, the absorbances were measured in a spectrophotometer UV-Vis using chloroform was used as blank.

Total phytosterol content

The phytosterols content was calculated using the photometric standard formula proposed to calculate steroids ²⁷:

$$C = C_p \cdot \frac{A_a}{A_p}$$

Where: C_a = Concentration; C_p = Standard Concentration; A_a = Absorbance of the sample; A_p = Absorbance of the standard.

Method validation

Method validation was performed on parameters preconized by ICH guidelines and the Brazilian validation guide, such as linearity, limit of sensitivities, selectivity, precision, accuracy, recovery and robustness^{28, 29}. Statistical analyses were carried out by linear regression, ANVOA and student's *t*-test, using the software Excel (Microsoft Corporation, New York, NY, USA).

Especificity

Method specificity was demonstrated by the overlap of standard solution (β -sitosterol) and samples containing roots of *A. hispidum* obtained in the range of 400-900 nm.

Standard calibration curve

The calibration curves were verified by analyzing three authentic curves, constructed with standard solution β -sitosterol in five concentration levels (0.02 - 0.10 mg/ mL). The results were analyzed by linear regression calculation using the least squares method, in order to define the coefficient of determination (R^2).

Linearity

The extractive from roots of *A. hispidum* was filtered through filter paper and diluted with chloroform. The calibration curve was made by linear regression and the results represented the average of three curves performed by three measurements of each concentration. The data were calculated by linear regression by least squares method, in order to set the coefficient of determination (R^2).

Limits of detection (DL) quantitation (QL)

Limits of detection (DL) quantitation (QL) were calculated in mg/mL according to following equations: $DL = DP_a \times 3/IC$ and $QL = DP_a \times 10/IC$, where DP_a is the standard deviation of y-intercept, that is obtained of three linearity curves and, IC is the average of angular coefficients (slope of the line) of respective curves.

Precision

Precision was evaluated by repeatability, which six individual determinations for the samples at 100% concentration for analysis were examined in the same, and, and the intermediate precision, which the measurements were performed by two analysts on two consecutive days using samples prepared under the same conditions. Accuracy

Accuracy

The recovery was determinate by addition of increasing known amounts of standard solution of β -sitosterol (0.02 to 0.06 mg/mL) to samples at 100% of analysis concentration. The recovery values were expressed as percentages by the ratio of the total phytosterol contents determined experimentally and their theoretical concentrations. Each sample was tested three times and the amount recovered was calculated.

Robustness

The robustness was carried out preliminarily by the following factors: solvent suppliers and several wavelengths for analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

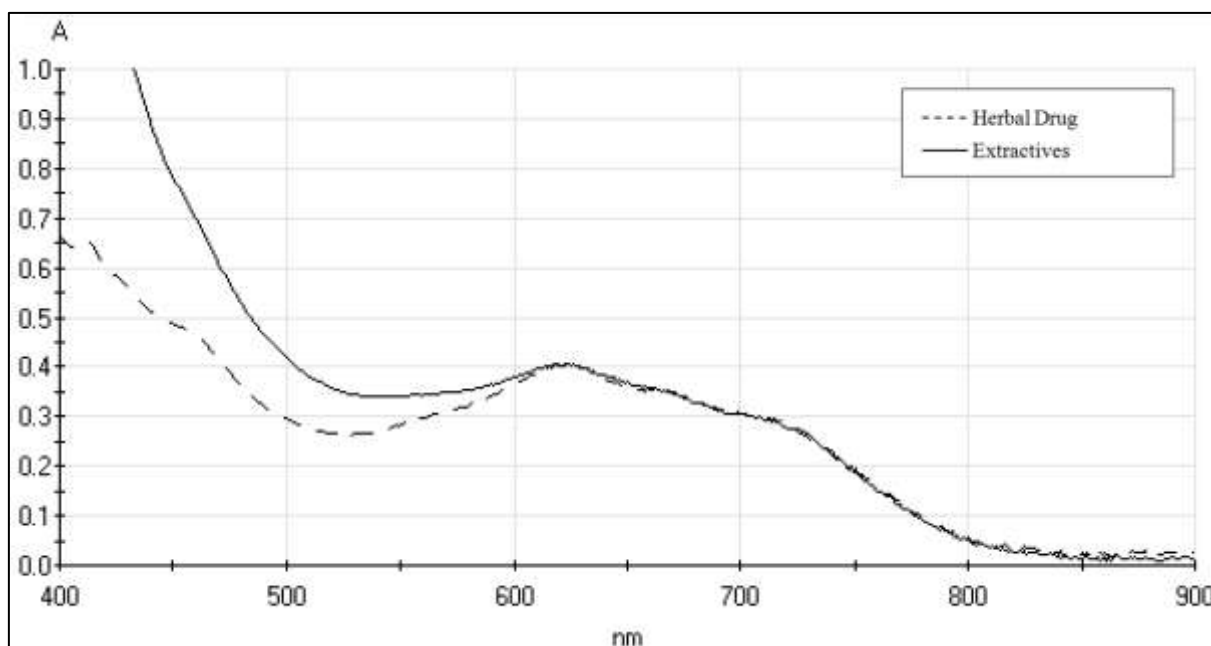
Method Development

Wavelength selection

In the presence of the Liebermann-Burchard reagent (HOAc/H₂SO₄), the phytosterols are submit to protonation followed by dehydration with loss of H₂O, which provide the formation of carbonium ions 3,5-cholestadiene. This process is the first step in the colorimetric reaction of LB. After that, there is the formation of a blue color because of oxidation reaction from pentacyclic cations^{30, 31, 32, 33}. The maximum observed for the blue product of oxidation occurs at 625 nm. Additionally, two other maximum can

be observed at 389 nm, due to a tetracyclic cation with a benzene ring ³⁴; and, at 410 nm from aromatic sulfonic acids, after being rearranged ^{24, 35}. Regarding the spectrum behavior for samples and standard (figure 1), it could be observed that the wavelength appropriated for the analysis was 625 nm. The data is in according to the literature and provide more specificity to the reaction product from LB-phytosterols.

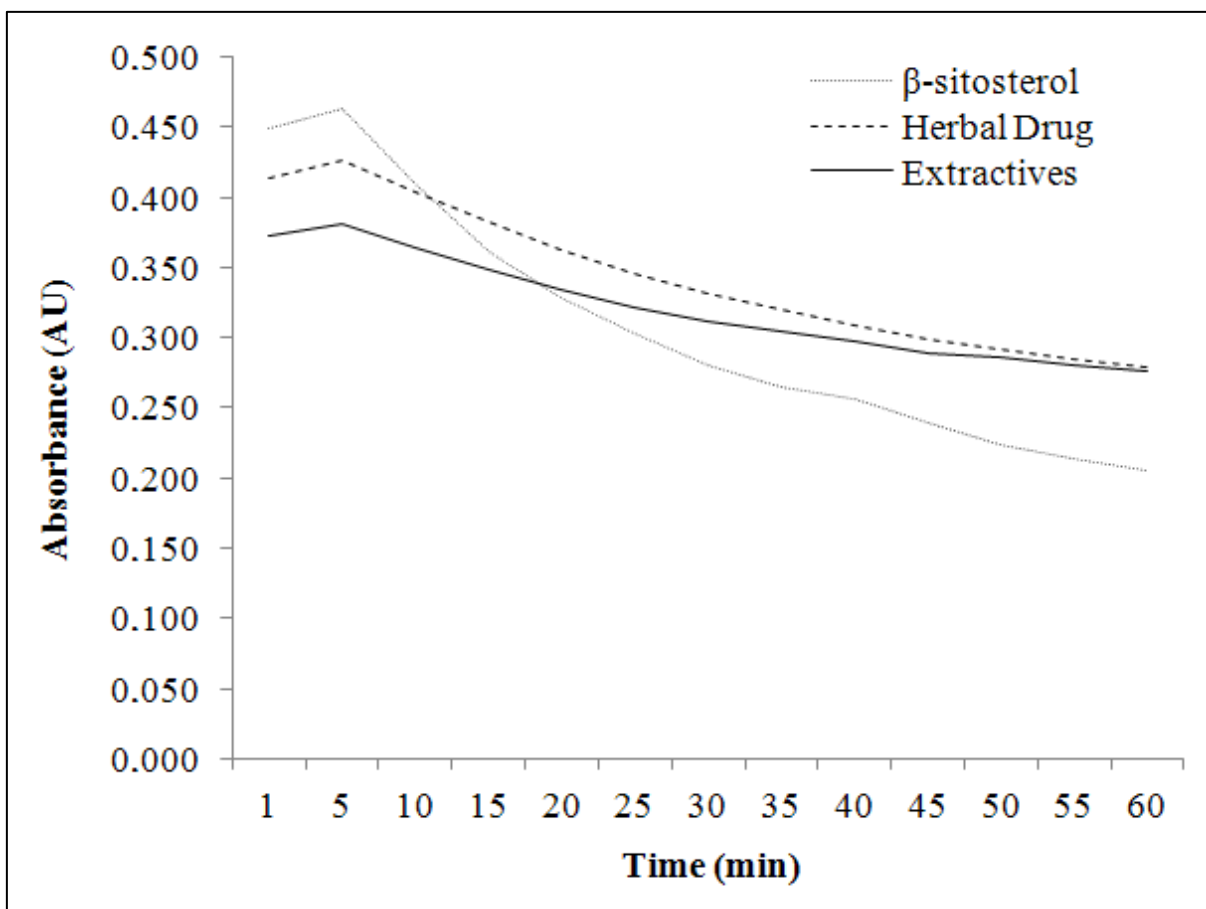
Figure 1. Spectrum for Liebermann-Burchard reactional product (400-900nm): herbal material and extractives from roots of *A. hispidum* roots.



Reaction time

According to the kinetics of reaction time for samples and the standard, it was possible to observe that the maximum of absorbance occurs after 5 minutes from the addition of the reagent (Figure 2). The data also confirm the behavior accelerated reaction as described by Moore and Baumann ³⁶, possibly due to conversion of steroid derivatives acetates after the reaction with reagent LB ³³, just as it is possible to observe the instability of the reaction product resulting decrease in absorbance read after the initial five minutes. On the other hand, a high reproducibility of the method ensured that in determining exactly 5 minutes after addition of the reagent, does not undergoes significant interference in response method.

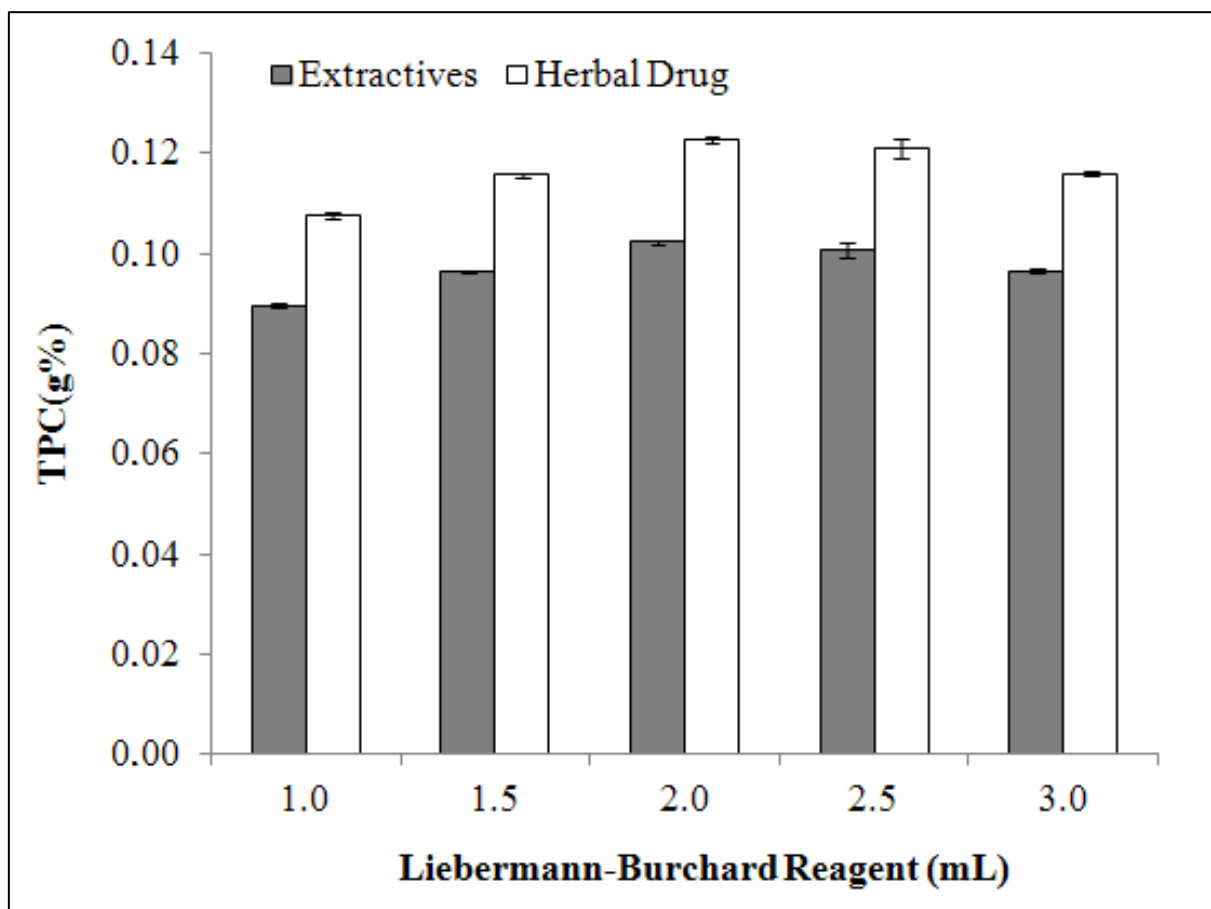
Figure 2. Influence of reaction time on the method response (absorbance) for Kinetic of reaction time to samples and standard, where x is the unit of time in minutes and y = absorbance (UA).



Liebermann-Burchard reagent optimization

The addition of excess acid due to increasing Liebermann-Burchard reagent resulted in decreased total phytosterols content. It was observed that after addition of 2mL Liebermann-Burchard reagent for samples (Figure 3).

Figure 3. Influence of Liebermann-Burchard reagent on total phytosterol content (TPC g%) for standard (β -sitosterol) and both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

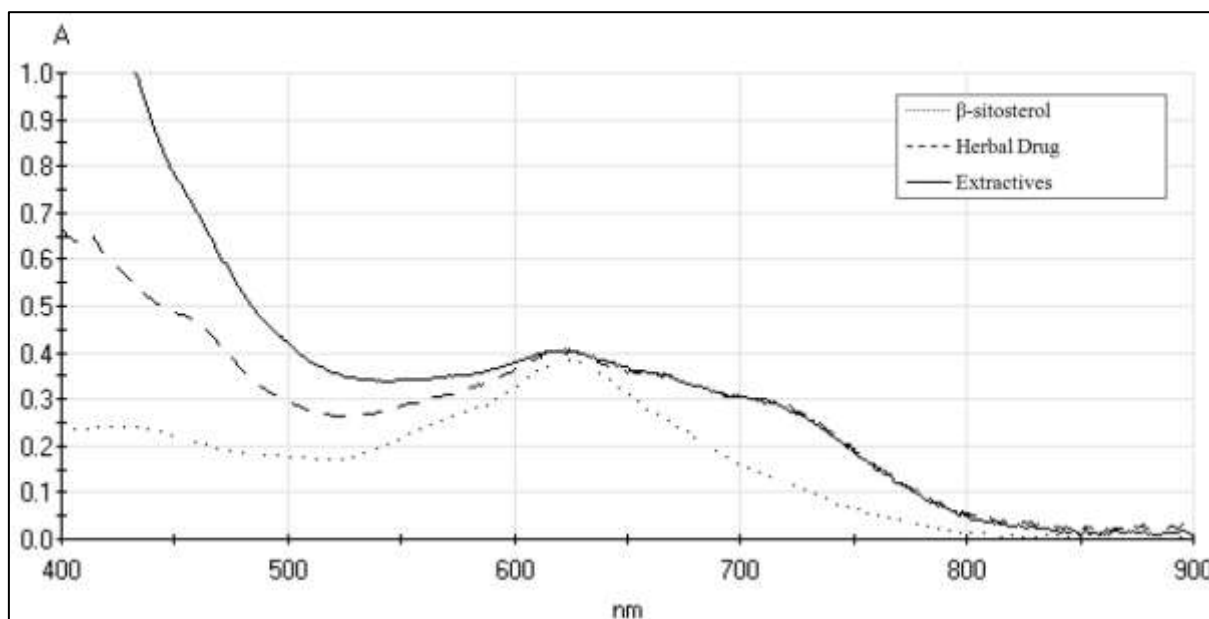


Validation

Specificity

The specificity of spectrophotometric methods plays an important role on analyses of complex matrices such as herbal drugs and derivatives. The interference is the major difficulty to develop reliable procedures. In this way, the comparative evaluation of the experimental spectrums provides the necessary information about similarities between standard solutions and samples. The figure 4 shows the spectrums from standard solution (β -sitosterol), herbal drug and extractives from *A. hispidum*. The spectrum acquisition was carried out after reaction with Liebermann-Burchard reagent and the results allowed observing that all solutions showed very similar behavior with maximum at 625 nm.

Figura 4. Spectrum for Liebermann-Burchard reactional product (400-900nm): reference solution (β -sitosterol), herbal material and extractives from roots of *A. hispidum* roots.



Calibration curves, linearity, detection and quantification limits

The calibration curves were evaluated after regression analysis and the linearity was performed by the determination coefficients (r^2) for concentration ranged from 80 to 120 % of work concentration. The data presented in table 1 suggested linear behaviors for standard and both samples curves (herbal material and extractives from *A. hispidum*), which R^2 values were higher than 0.99 as preconized by the Brazilian Agency (RE 899, 2003). Thus, more than 99% of the experimental variability could be explained by the linear models, which confirm the satisfactory relationship between analyte concentrations and spectrophotometric responses. Regarding the detection and quantification limits (LOD and LOQ), it was found that the spectrophotometric procedure provide sensitivity responses able for detection and quantification of total phytosterol either in herbal material or extractives without important interference from instrumental technique (Table 1)

Tabela 1. Calibration data for standard (β -sitosterol) and both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

SAMPLE	Model Coefficients	R^2	Range (mg/mL)	LOD (g%)	LOQ (g%)
β -sitosterol	a = 6.3117 b = 0.0124	0.9981	0.02 - 0.10	-	-
Herbal Drug	a = 0.0078 b = 0.0022	0.9975	37.0-87.5	0,0086	0,0285
Extractives	a = 0.0817 b = 0.0199	0.9918	3.08- 9.24	0,0069	0,0232

Precision

The precision of analytical procedures was assayed at two levels: repeatability and intermediary precision. The method showed low relative standard deviations (RSD%) at the two levels for both samples (herbal drug and extractives). Thus, at the first level (repeatability) the maximum relative standard deviation was 2.99 % (Table 2), no statistical difference was observed for the second level (intermediary precision), although the method was appraised on different days (Table 3). In this way, the method was considered precise in according to the national legal requirements (BRAZIL, 2003).

Table 2. Repeatability test: total phytosterol content (TPC g%) for both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

SAMPLE	TPC (g%) (mean $\pm$ sd; RSD%)
Herbal drug	0.146 $\pm$ 0,014 (2.99)
Extractives	0.096 $\pm$ 0.001 (1.41)

Accuracy

The accuracy or recovery of an analytical method express the nature of complex matrix such as herbal materials. In fact, several source of interferences or variations

such as: extraction conditions (degradation and partial extraction), reagents, similar chromophores and ect; can improve or decrease the analytical response leading to incorrect results. Thus, accurate procedures are free from interference and the method responses are due to the analyte concentration. In order to determine the accuracy for both samples (herbal drug and extractives), they were spiking by the standard (0.02 to 0.06 mg/mL) and the parameter was calculated from the recovery of total phytosterol content. The data showed recoveries ranged between 98.5 and 100.38% for herbal drug, and from 97.51 to 98.99% for extractives from roots of *A. hispidum* (Table 4). In both cases, the recovery results higher than 95 % confirm that the proposed quantitative procedures are in accordance to legal requirements and provides reliable results.

Robustness

In this parameter, small and deliberate variations in analytical methodology were evaluated. As the objective of this study was to develop and standardize an analytical method, its validity was tested in different sources of variation, such as the solvent manufacturer (Quimex ® and Fmaia ®) and wavelength (623 to 627nm). Through the variation of the manufacturer of the solvent (Quimex ® and Fmaia ®) was observed that the phytosterol content did not show significant differences, as in relation to the wavelength, indicating that the proposed method is also resistant to changes in standard conditions. The coefficients of variation varied from 0.66 to 2.37 for herbal drugs, and 0.71 to 1.85 for hydroethanolic extract (Table 5), showing up for the sources of variation in the study below 5% as normative guidance confirming the robustness of the method.

Conclusion

To maintain quality of herbal medicine, it is necessary to ensure the coexistence of substances with biological or chemical groups present in the species. From these considerations, it was possible to develop and validate analytical methodology by UV-Vis spectrophotometry to quantify the phytosterols in roots of *A. hispidum* and finished products. The analytical method was validated in 625 nm, showing linearity with a coefficient of determination greater than 0.99. It was considered robust

according to the sources of variation analyzed. Just as it was possible to ensure the precision and accuracy of the method. Thus, the spectrophotometric analytical method UV-Vis therefore constitutes an alternative tool, useful, low cost and easy to perform quality control of total phytosterols in roots of *A. hispidum* and products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FACPE and CNPq for financial support in the form of Grants (475216/2011-3; 483870/2011-0) and Fellowship Awards (312537/2009-3; 480128/2012-0).

REFERENCES

1. Maciel, S.S.; Paulo, M.Q.; Souza, C.O.; Silva, L.G.; Tavares. *Rev. Bras. Ciênc. Saúde*. **1997**, *1*, 23.
2. Noumi, E.; Dibakto, T.W. *Fitoterapia*. **2000**, *71*, 406.
3. Fleischer, T.C.; Ameade, E.P.K.; Sawyer, I.K. *Fitoterapia*. **2003**, *74*, 130.
4. Agra, M.F.; Franca, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. *Rev. Bras. Farm.* **2007**, *17*, 114.
5. Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basilio, I.J.L.D.; Franca, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. *Rev. Bras. Farm.* **2008**, *18*, 472.
6. Araujo, E.L.; Randau, K.P.; Sena-Filho, J.G.; Mendonça, R.M.; Xavier, H.S. *Rev. Bras. Farm.* **2008**, *18*, 777.
7. Brasil; Resolução RE nº899 de 29/5/2003; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
8. Araujo, E.L.; Randau, K.P.; Xavier, H.S.; Ferreira, C.P.; Mendonça, R.M. *Rev. Bras. Farm.* **2007**, *88*, 159.

9. Abidi, S.L. *J. Chromatogr., A*, **2001**, 935, 173.
10. Lembcke, J.; Ceglarek, U.; Fiedler, G.M.; Baumann, S.; Leichtle, A.; Thiery, J. *J. Lipid Res.* **2005**, 46, 21.
11. Liu, S.; Ruan, H. *Chem. Phys. Lipids.* **2013**, 166, 18.
12. Lagarda, M.J.; García-Llatas, G.; Farré, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 1486.
13. Kuksis, A. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 935, 203.
14. Burkard, I.; Rentsch, K.M.; Von Eckardstein, A. *J. Lipid Res.* **2004**, 45, 776.
15. Marques, G.S.; Monteiro, R.P.M.; Leão, W.F.; Lyra, M.A.M.; Peixoto, M.S.; Rolim-Neto, P.J.; Xavier, H.S.; Soares, L.A.L. *Química Nova.* **2012**, 35, 517.
16. Komarova, N.I.; Rogachev, A.D.; Chernyak, E.I.; Morozov, S.V.; Fomenko, V.V.; Salakhutdinov, N.F. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, 45, 27.
17. Silva, K.G.H.; Júnior-Xavier, F.H.; Farias, I.E.G.; Silva, A.K.A.; Neto, J.A.C.; Souza, L.C.A.; Santiago, R. R.; Júnior-Alexandrino, F.; Júnior-Nagashima, T.; Soares, L.A.L.; Santos-Magalhães, N.S.; Egito, E.S.T. *Phytochem. Anal.* **2009**, 20, 265.
18. Fernandes, A.J.D.; Ferreira, M.R.A.; Randau, K.P.; De Souza, T. P.; Soares, L.A.L. *The Scientific World J.* **2012**, 2012, 1.
19. Marques, G.S.; Leão, W.F.; Lyra, M.A.M.; Peixoto, M.S.; Rolim-Neto, P.J.; Xavier, H.S.; Soares, L.A.L. *Rev. Bras. Farm.* **2013**, 23(1), 51.
20. Bartos, J.; Pesez, M. *Pure Appl Chem.* **1979**, 51, 2157.
21. Kumar, R.; Singh, P.; Singh, H. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, 3 (2), 178.

22. Liebermann, N. C. *Chem. Ber.* **1885**, 18, 1803.
23. Burchard, H. *Chem. Zentralblatt*, **1890**, 61, 25.
24. Burke, R.W.; Diamondstone, B.I.; Velapoldi, R.A.; Menis, O. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)*. **1974**, 20, 794.
25. Xiong, Q.; Ruan, B.; Whitby, F.G.; Tuohy, R.P.; Belanger, T.L.; Kelley, R.I.; Wilson, W.K.; Schroepfer, G.J. Jr. *Chem. Phys. Lipids*. **2002**, 115, 1.
26. Kenny, A.P. *Clinical Laboratorie*. **1952**, 52, 611.
27. Kim, E.; Goldberg, M.A. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)*. **1969**, 12, 1171.
28. ICH. Harmonised Tripartite Guideline: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 2005.
29. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.
30. Yoder, L.; Thomas, B.H. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 50, 113.
31. Brieskorn, C.H.; Hofmann, H. *Arch. Pharm.* **1964**, 297, 37.
32. Sorensen, T.S. *J Am Chem Soc.* **1965**, 87, 5075.
33. Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Pang, J. *Lipids*. **2007**, 42, 87.
34. Deno, N.C.; Pittman, C.U. Jr.; Turner, J.O. *J Am Chem Soc.* **1965**, 87, 2153.
35. Velapoldi, R.A.; Diamondstone, B.I.; Burke, R.W. *Clin Chem.* **1974**, 20, 802.
36. Moore, P.R.; Baumann, C.A. *J. Biol. Chem.* **1952**, 195, 615.

36. Moore, P.R.; Baumann, C.A. Skin sterols I. Colorimetric determination of cholesterol and other sterols in skin. *J. Biol. Chem.* **1952**, 195, 615–621.

Suplementer Material

The tables with the results of the analysis given for intermediate precision, accuracy and robustness.

Tabela 3. Intermediate precision test: total phytosterols content (TPC g%) for both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

	Day1		Day 2	
	Drug material	Extractives	Drug material	Extractives
Analyst 1	0.146± 0.014 (2.98)	0.099 ± 0.001(1.08)	0.145± 0.018 (3.85)	0.099± 0.001 (1.48)
Analyst 2	0.142± 0.017 (3.75)	0.098± 0.001(1.36)	0.143± 0.009 (2.04)	0.102± 0.001(1.14)

Tabela 4. Accuracy test: recovery (%) for both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

SAMPLE	Herbal Drug Accuracy (%)	Extractives Accuracy (%)
Sample 1	100.39± 1.87 (1.87)	97.52± 1.26 (1.29)
Sample 2	100.18± 3.41 (3.40)	99.74± 0.83 (0.83)
Sample 3	98.85± 3.99 (4.04)	99.00± 1.55 (1.56)

Table 5. Robustness test: total phytosterols content (TPC %) for both herbal drug and extractives from roots of *A. hispidum*.

Source or Variation	Herbal Drug TPC (%)	Extractives TPC (%)
Solvent supplier		
Quimex ®	0.114 ± 0.003 (2.37)	0.096± 0.001 (1.08)
Fmaia ®	0.111 ± 0.001 (0.88)	0.099 ± 0.002 (1.86)
λ nm		
623nm	0.123 ± 0.003 (0.66)	0.103 ± 0.001 (0.71)
624nm	0.124 ± 0.003 (0.74)	0.104 ± 0.001 (0.79)
625nm	0.124 ± 0.004 (1.00)	0.103 ± 0.001 (0.87)
626nm	0.124 ± 0.005 (1.37)	0.103 ± 0.001 (0.75)
627nm	0.124 ± 0.005 (1.14)	0.103 ± 0.001 (0.76)

CAPÍTULO IV

Manuscrito II: Teor de fitosteróis totais em xarope de raízes de
Acanthospermum hispidum

6.1 Teor de fitosteróis totais em xarope de raízes de *Acanthospermum hispidum*

ARAÚJO, L.B.D.C.¹; SILVA, S.L.²; GALVÃO, M.A.M.²; FERREIRA, M.R.A.¹; ARAÚJO, E.L.³; RANDAU, K.P.^{1,2}; SOARES, L.A.L.^{1,2}

¹PPgCF – Universidade Federal de Pernambuco

²DCFAR - Universidade Federal de Pernambuco

³CFAR - Faculdade Pernambucana de Saúde

RESUMO

O emprego de medicamentos fitoterápicos, no Brasil, vem se consolidando nos últimos tempos. O aumento no uso de fitoterápicos pela população tem se traduzido em preocupação com a qualidade de tais produtos, devido aos problemas comumente encontrados referentes à autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais e produtos acabados. A partir destas considerações, planejou-se o desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria UV-Vis para quantificar os fitosteróis presentes em xarope contendo raízes de *A. hispidum*, contribuindo para sua regulamentação junto à ANVISA, uma vez que ainda não possuem parâmetros de qualidade estabelecidos. Xarope contendo raízes de *A. hispidum* foi submetido à partição em funil de separação com *n*-hexano. Após filtração, a fração *n*-hexânica foi levada à secagem sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspenso em clorofórmio, e o volume, ajustado para balão volumétrico de 50 mL. A amostra foi utilizada para o desenvolvimento e validação do método analítico (BRASIL, 2003). O método analítico foi validado em 625 nm, apresentando-se linear, o método é considerado robusto, exato e reprodutível de acordo com os fatores exigidos pela legislação vigente. Assim, o método analítico espectrofotométrico UV-Vis constitui uma ferramenta alternativa, útil, de baixo custo e fácil execução no controle de qualidade de fitosteróis totais em xarope de raízes de *A. hispidum*.

Palavras chaves: *Acanthospermum hispidum*. Xarope. Fitosteróis. Liebermann-Burchard.

ABSTRACT

The therapeutic use of herbal medicines in Brazil, has been consolidating in recent times. The increase in the use of herbal medicines by the population has been understood as a concern about the quality of such products, due to problems commonly found regarding authenticity, purity and chemical composition of vegetable raw materials and finished products. Herbal medicines should offer quality assurance, have proven therapeutic effects, standardized composition and safety of use for the population without risks to public health. From these considerations, the development of syrup of the roots from *Acanthospermum hispidum* and validation of analytical method by spectrophotometric UV-Vis to quantify the phytosterols present in syrup were planned, contributing to its regulation next to ANVISA, since they still do not have established parameters of quality. The prepared syrup (240,0 mL) was partitioned in a separate hopper with n-hexane. After filtration, the n-hexane fraction was taken to dryness under reduced pressure. The residue was resuspended in chloroform and the volume was adjusted to a 50,0 mL graduated flask. The sample was used for the development and validation of analytical method (BRAZIL, 2003). The analytical method for n-hexane fraction of the syrup was validated in 625 nm, showing linear, the method is considered robust, accurate and reproducible according to the factors required by current law. Thus, the UV-Vis spectrophotometric analytical method is an alternative tool, useful, low cost and easy to perform in quality control of total phytosterols in syrup of roots from *A. hispidum*.

Key-words: *Acanthospermum hispidum*. Syrup. Phytosterols. Liebermann-Burchard.

INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, empregando-se derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, suco e outros) (ANVISA, 2009). São considerados uma modalidade de terapia complementar ou alternativa em saúde (ANDRADE, 2000). O emprego de medicamentos fitoterápicos, no Brasil, vem se consolidando nos últimos tempos, representando, assim, um segmento do mercado farmacêutico bastante promissor (ARAÚJO et al., 2006; COUTO et al., 2009.). O segmento tradicional cresce, mundialmente, de 3% a 4% ao ano, enquanto o de fitoterápicos cresce cerca 6% a 7% (BOTSARIS, 2012;).

O aumento no uso de fitoterápicos pela população mundial também tem se traduzido em preocupação com a qualidade de tais produtos, devido aos problemas comumente encontrados referentes à autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais que contribuem para um fitoterápico de má qualidade. No mercado brasileiro, esses problemas são frequentemente encontrados em várias regiões do país (BORELLA; FONTOURA, 2002; AMARAL et al., 2003; MELO et al., 2004; MARLIÉR et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008).

Neste contexto, está inserido o xarope de raízes de *A. hispidum*, o qual ainda não possui relatos na literatura sobre o doseamento dos princípios ativos do extrato desta espécie, para estabelecer um controle de qualidade ideal, tanto para a matéria-prima, quanto para o produto acabado.

Atualmente, formulações do xarope de raízes de *Acanthospermum hispidum*, utilizados na medicina popular (MACIEL et al., 1997; MORAIS; DANTAS; SILVA, 2005; TORRES et al., 2005; AGRA; FRANCA; BARBOSA-FILHO, 2007; ARAÚJO et al., 2008), não possuem registro junto à ANVISA, não cumprindo, desta forma, os requisitos mínimos de qualidade, estes apenas poderão ser inseridos nos serviços de saúde pública, de forma segura, com certificação da qualidade (RENGER, 2000).

A implantação da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde deve ser cercada de cuidados relativos aos fitoterápicos com qualidade. Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população, sem riscos à saúde pública. A eficácia e a segurança devem ser

validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. Na manutenção da qualidade do fitoterápico, é necessário assegurar a coexistência de substâncias com atividade biológica, ou grupos químicos, presente na espécie, visto que os princípios ativos de muitas plantas não são quantificados através de métodos analíticos (ANVISA, 2009).

A partir destas considerações, planejaram-se o desenvolvimento e validação da metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para o doseamento de fitosteróis totais presentes no xarope de raízes de *A. hispidum* utilizando o reagente Liebermann-Burchard, contribuindo para sua regulamentação definitiva junto à ANVISA.

METODOLOGIA

Material Vegetal

A matéria-prima vegetal *Acanthospermum hispidum* foi coletada no canteiro de cultivo de plantas medicinais do Laboratório de Fitoterapia da Prefeitura Municipal de Olinda (PE) (Latitude -8,0131, Longitude -34,8617). A exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), sob o número 73350. O material coletado foi seco à sombra e submetido à moagem em moinho de facas.

Reagentes e Substância de Referência

Os solventes utilizados foram todos de grau analítico: Clorofórmio PA (CHCl_3) (FMaia® e Quimex®), Anidrido Acético PA (FMaia®), Ácido Sulfúrico (FMaia®), Etanol (Cinética®). Foi utilizado como padrão o β -Sitosterol (Sigma-Aldrich®).

Reagente Liebermann-Burchard

No preparo do reagente de leitura das amostras, foram transferidos 50,0 mL de anidrido acético para um frasco âmbar mantido em banho de gelo. Após 30 minutos em repouso, foram adicionados 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (KENNY, 1952).

Desenvolvimento do método espectrofotométrico

As especificações do procedimento para preparação da amostra e condições experimentais para leitura espectrofotométrica das amostras estão descritas nos itens a seguir.

Preparação das amostras

- Xarope

A matéria-prima vegetal seca e pulverizada (20) foi macerada por 7 dias, empregando-se etanol 70% (100,0 mL) como líquido extrator. Após filtração, 17,0 mL do filtrado foi inserido em xarope confeccionado através da dissolução em agitador magnético múltiplo (Modelo RO-15 Power, IKA®,) de 100g de açúcar em 54,0 mL de água mineral.

Alíquotas de xarope preparado a partir de raízes de *Acanthospermum hispidum* (240,0 mL) foram transferidas para béquer, no qual foram adicionados 80,0 mL de *n*-hexano e submetidas à agitação magnética por 12 horas. As alíquotas foram transferidas para funil de separação, separando a fração *n*-hexânica, o procedimento foi repetido por mais duas vezes, com tempo de agitação magnética de 6 horas. As frações *n*-hexânicas foram reunidas e em seguida levadas à secagem sob pressão reduzida a 40°C. O resíduo foi ressuspenso em 20,0 mL de clorofórmio e 10 mL de água, em seguida particionado em funil de separação, utilizou-se a fração clorofórmica, e o volume, ajustado para 50 mL em balão volumétrico, com a adição de clorofórmio.

- Extrato hidroetanólico

O material vegetal seco e pulverizado (20 g) foi macerado por 7 dias, empregando-se etanol 70% (100,0 mL) como líquido extrator. Após ser filtrado, o macerado foi levado à secura sob pressão reduzida, a 40°C. O resíduo foi ressuspenso em 20 mL de clorofórmio e 10 mL de água, em seguida particionado em funil de separação, utilizando-se a fração clorofórmica, posteriormente, o volume foi ajustado para 50,0 mL, com a adição de clorofórmio.

Preparação das amostras para leitura em espectrofotômetro

Alíquotas das amostras foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, onde foram adicionados 2,0 mL do reagente de Liebermann-Burchard. O volume foi ajustado com clorofórmio. Após a adição da solução reagente, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV/Vis (Evolution 60S, ThermoScientific®, Germany), utilizando clorofórmio como branco.

Determinação comprimento de onda

Sucessivas diluições foram realizadas a partir da fração *n*-hexânica, padrão e extrato hidroetanólico em balões volumétricos de 10,0 mL e foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na faixa de 400 a 900nm, após 5 minutos da adição do reagente de leitura, para identificação da diluição e do comprimento de onda que apresentassem o valor de absorbância mais adequado para o método. Utilizou-se o clorofórmio como solução de compensação.

Determinação do tempo de reação

A influência do tempo de reação sobre a resposta do método para o padrão e fração *n*-hexânica foi estudada através da realização de uma cinética, em intervalos de 5 minutos, durante 1 hora, após adição de reagente de leitura.

Avaliação da proporção do Reagente de Liebermann-Burchard

Alíquotas da fração *n*-hexânica (4,70 mg/mL), foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, e foram adicionadas diferentes alíquotas (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL) do reagente de Liebermann-Burchard. Após adição do reagente, o volume foi ajustado com clorofórmio, e a absorbância, mensurada em espectrofotômetro, utilizando clorofórmio como branco.

Curva de Calibração do Padrão

A curva de calibração do método foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas, construídas com amostras da solução do padrão o β -sitosterol, com cinco níveis de concentração (0,02 - 0,100 mg/mL). Os resultados foram tratados através de cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de correlação (R^2), sendo $R^2 > 0,99$ como valor mínimo aceitável.

Validação do método espectrofotométrico

A metodologia descrita foi avaliada quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez, conforme a Resolução RE 899 da ANVISA, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e ICH-Q2 (R1) (ICH, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo coeficiente de variação percentual (CV), não se admitindo valores superiores a 5%. A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa computacional Excel (Microsoft Office 2007).

Especificidade

A especificidade do método foi demonstrada através da sobreposição dos espectros do padrão e da fração *n*-hexânica do xarope das raízes de *A. hispidum* obtidos na faixa de 400-900nm.

Linearidade

O teste foi realizado a partir de três curvas autênticas, construídas com cinco concentrações de fração *n*-hexânica de xarope das raízes de *A. hispidum* (3,13 a 9,40 mg/mL). Os resultados foram tratados através de cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de correlação (R^2), sendo $R^2 > 0,99$ como valor mínimo aceitável.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados em g %, de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas.

Precisão

A precisão foi avaliada pela repetitividade, na qual foram examinadas, em um único dia, seis determinações individuais para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de extrações de raízes e pela precisão intermediária, a qual foi determinada por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%.

Exatidão

A interferência da matriz sobre a resposta do método foi avaliada sob o aspecto da capacidade de extração dos analitos (teste de recuperação). Foram adicionadas quantidades conhecidas e crescentes da solução de referência (0,02-0,06 mg/mL) à amostras 100% da concentração de análise. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram calculados através da razão entre as concentrações determinadas experimentalmente e as respectivas concentrações teóricas.

Robustez

O ensaio para avaliar a robustez do método foi realizado a partir das seguintes fontes de variação: concentração do reagente de leitura Liebermann-Burchard, marca do solvente e mudança no comprimento de onda na leitura das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método

Preparação da amostra

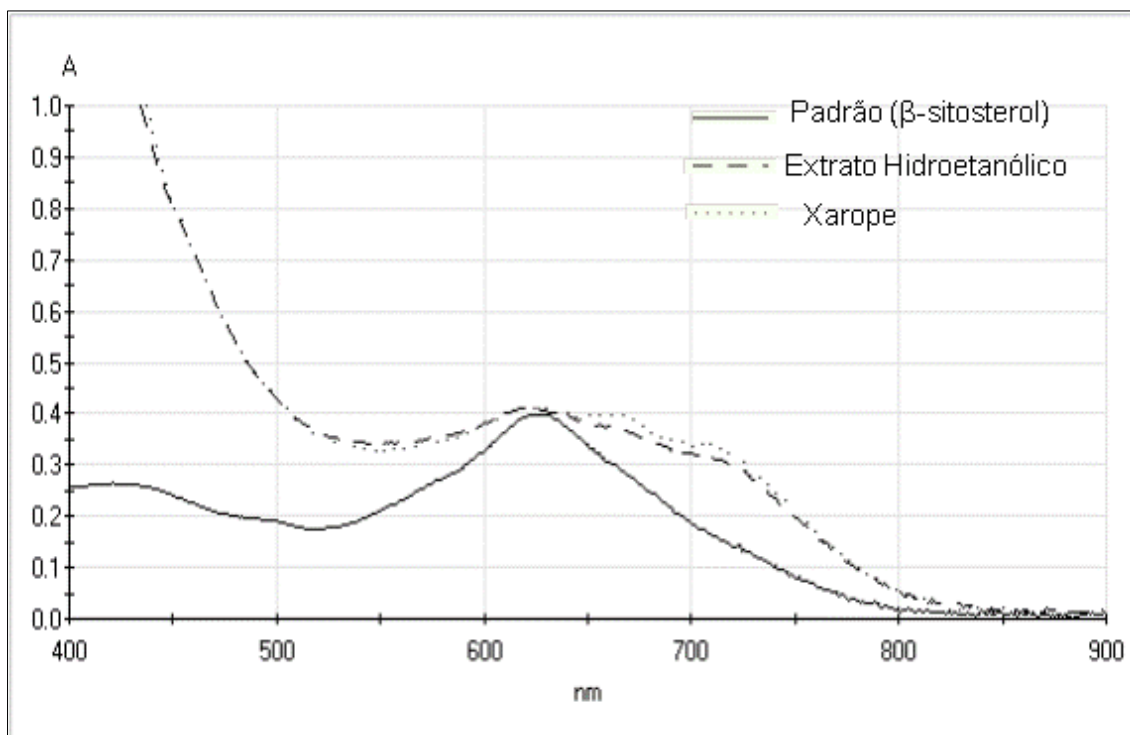
O xarope foi submetido à partição a fim de remover o açúcar e a água, pois a presença dos mesmos, após adição de clorofórmio, forma uma mistura bifásica. Em seguida, o filtrado foi levado à secura, sob pressão reduzida, retirando, desta forma, o etanol, uma vez que a presença deste, após adição do reagente Liebermann-Burchard, forma precipitados azuis escuros, dificultando a mensuração da absorbância no espectrofotômetro.

Determinação comprimento de onda

Após adição do reagente de leitura observar a formação de cor azul escuro, no meio reacional, devido a produção de grupos cromóforos a partir da reação de fitosteróis com reagente Liebermann-Burchard ($\text{HOAc}/\text{H}_2\text{SO}_4$) (COOK,1961). Os fitosteróis, provavelmente são protonados e posteriormente desidratados, levando a formação do íon carbânio 3,5-colestadieno, sendo este processo o primeiro passo para a reação colorimétrica. Posteriormente, devido oxidação, há formação de cátions pentaencíclicos, observando-se a cor azul no meio reacional (YODER; THOMAS, 1954; BRIESKORN; HOFMANN, 1964; SORENSEN, 1965; XIONG; 2007), que absorvem em 625 nm, responsável pela absorbância máxima (Figura 1). A presença de ácidos sulfônicos aromáticos, após sulfonação e rearranjos, apresenta absorbância em 410 nm (BURKE et al., 1974; VELAPOLDI et al., 1974). O padrão proposto para reações de esteróides por Burke e colaboradores (1974), de acordo

com o qual os cromogêneos são carbocations pentaencíclicos formados a partir de uma sequência de processos oxidativos, parece ser bem aceita pela comunidade científica (ZUMAN,1991; XIONG; 2007).

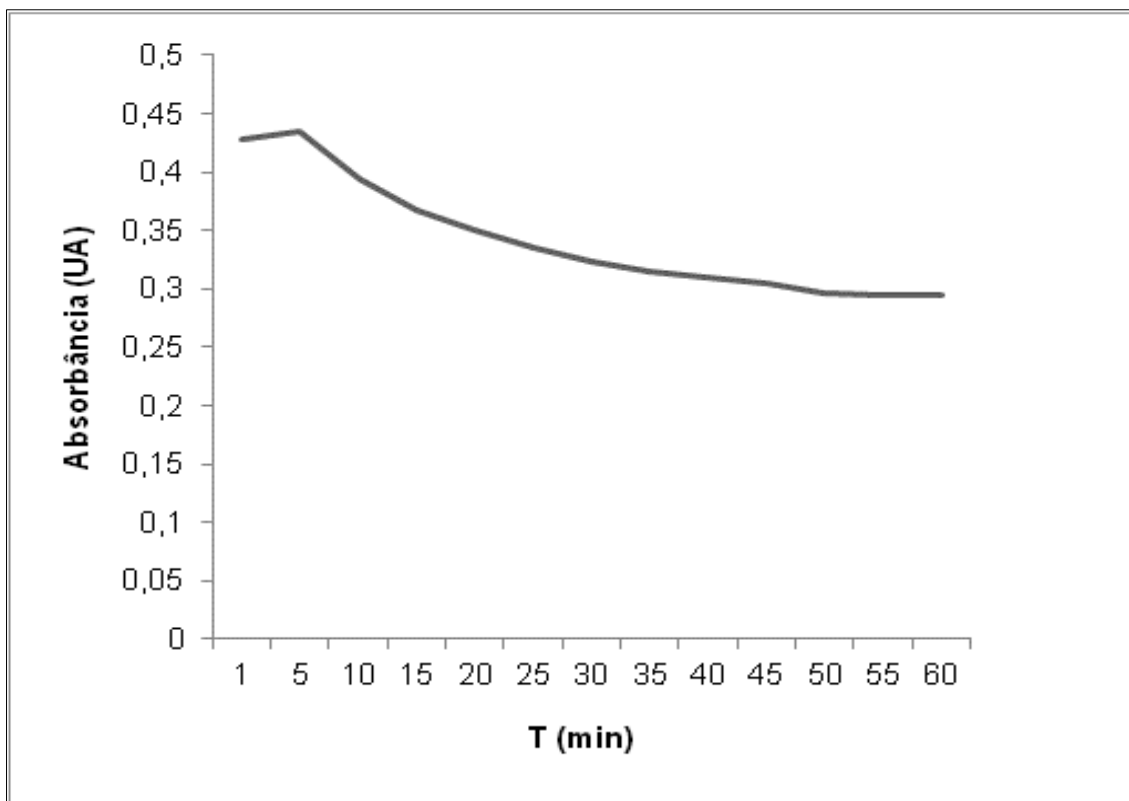
Figura 1. Determinação do comprimento de onda construído de amostras contendo padrão (β -sitosterol), extrato hidroetanólico e fração *n*-hexânica de xarope contendo raízes de *A. hispidum* na região de 400 a 900 nm.



Determinação do tempo de reação

De acordo com a cinética de tempo de reação para as amostras e para o padrão, foi possível observar que o máximo de absorvância ocorre após 5 minutos da adição do reagente (Figura 2). Os dados ainda confirmam o comportamento reacional acelerado conforme descrito por Moore e Baumann (1952), possivelmente devido à conversão de fitosteróis a derivados de acetato, após reação com reagente Liebermann-Burchard; é possível observar, também, a instabilidade do produto reacional ocasionando a queda na absorvância lida após os 5 minutos iniciais.

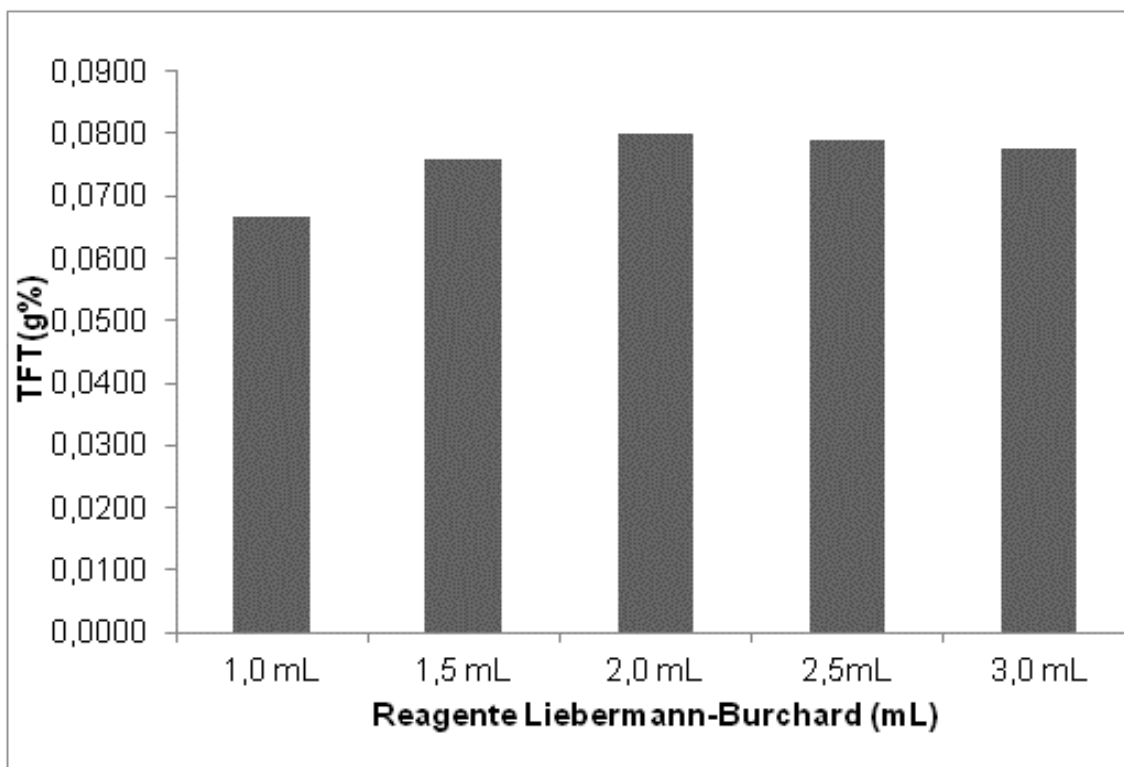
Figura 2: Resultados da determinação do tempo de reação para fração *n*-hexânica de xarope de raízes de *A. hispidum*.



Avaliação da proporção do Reagente de Liebermann-Burchard

De acordo com a avaliação da proporção do reagente Liebermann- Burchard, conclui-se que o aumento do reagente Liebermann-Burchard resultou em uma reação lenta e diminuição do teor de fitosteróis conforme figura 3, provavelmente devido ao aumento da acidez no meio reacional. Além disto, observou-se que após a adição de 2,0 mL do reagente Liebermann-Burchard em fração *n*-hexânica do xarope com concentração 4,70 mg/mL, foi possível quantificar um maior teor de fitoesteróis frente a 1,0; 1,5; 2,5 e 3,0 mL de reagente Liebermann-Burchard quando adicionados a alíquotas de mesma concentração da fração *n*-hexânica do xarope.

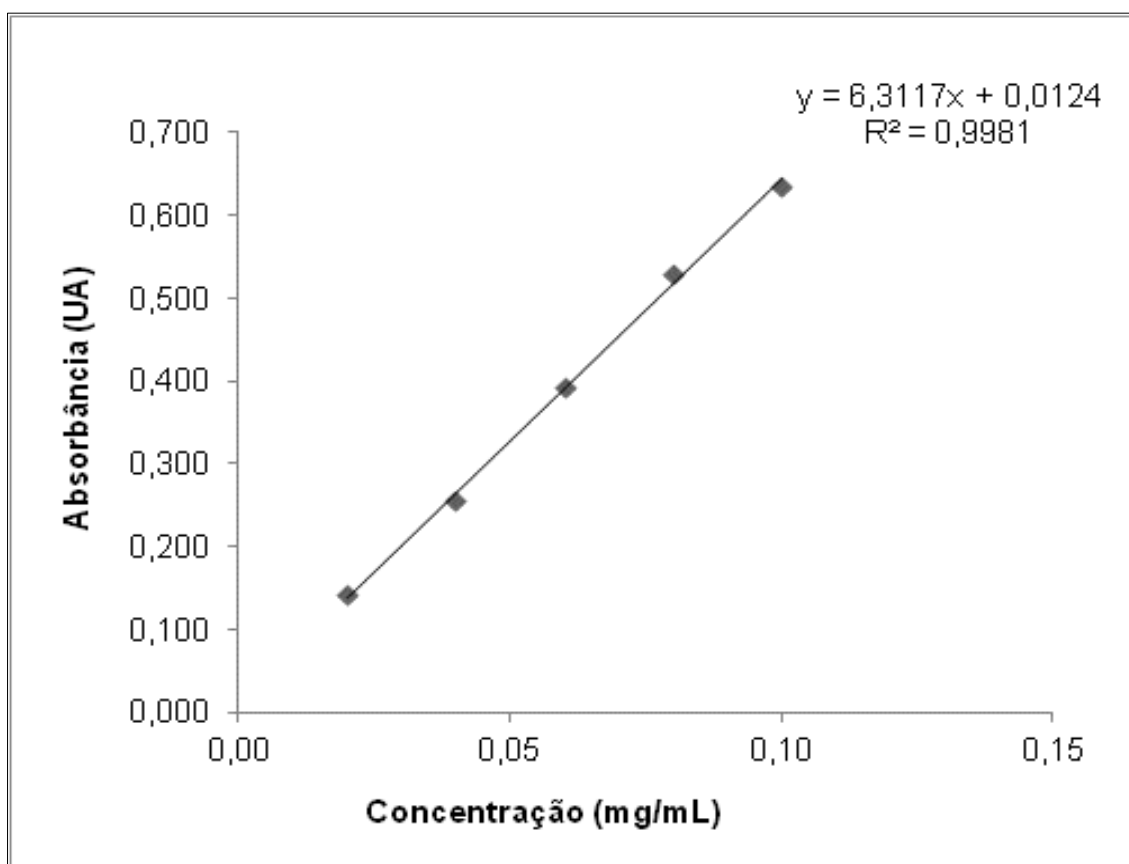
Figura 3. Resultados para proporção do reagente Liebermann-Burchard. Teor de fitosteróis totais (TFT(g%)).



Curva de Calibração do padrão

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9982. O resultado indica que o procedimento apresenta comportamento linear dentro dos limites das concentrações estudadas (0,02 a 0,100 mg/mL). Os dados experimentais para a análise do padrão β -sitosterol foram descritos pela seguinte equação da reta: $y = 6,3111x + 0,0124$ (Figura 4).

Figura 4. Curva de calibração para solução de referência (β -sitosterol).



Validação do método

Especificidade

Na Figura 1, estão apresentados os espectros de varredura obtidos para a solução de referência (β -sitosterol) e o espectro da fração *n*-hexânica do xarope das raízes de *A. hispidum*. A avaliação dos espectros permitiu observar que há similaridade importante entre os espectros da solução empregada como referência e fração *n*-hexânica de xarope de raízes de *A. hispidum*, confirmando a especificidade do método.

Linearidade, Limites de detecção e quantificação

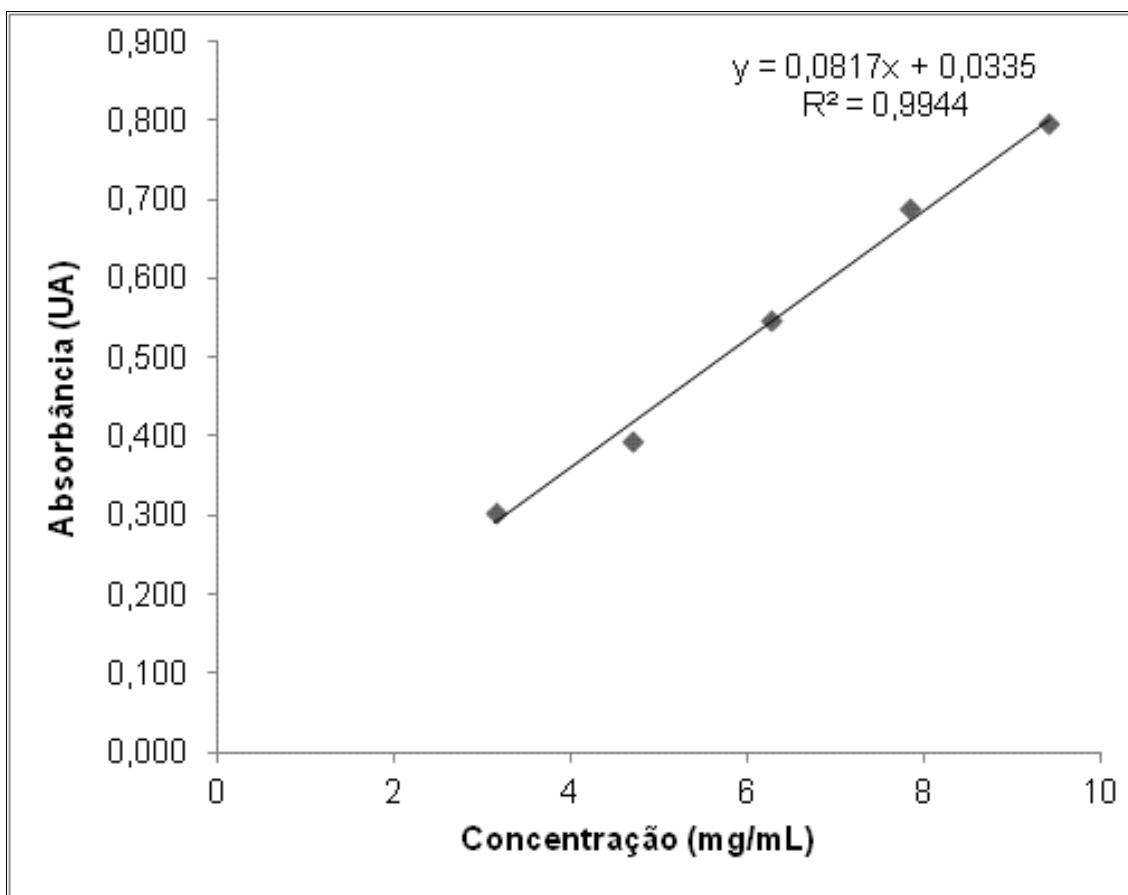
A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou coeficiente de determinação (R^2) 0,9944, denotando que mais de 99% da variabilidade experimental é explicada pela equação de regressão linear, comprovando a relação

linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta espectrofotométrica, com equação da reta $y = 0,0817x + 0,0335$ (Figura 5). Os resultados permitiram afirmar que o desempenho dos procedimentos atende os requisitos preconizados para análise.

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada; e a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitável, sob as condições experimentais adotadas, definem o limite de detecção e quantificação respectivamente.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o método apresentaram resultados 0,0052 e 0,0172 (g%), respectivamente. Com esses dados, verificou-se que os procedimentos proporcionam respostas espectrofotométricas com sensibilidade para detecção e quantificação dos fitosteróis totais na fração *n*-hexânica de xarope contendo raízes de *A. hispidum* com a confiabilidade desejada.

Figura 5. Linearidade para fração *n*-hexânica de xarope contendo raízes de *A. hispidum* (3,136- 9,408 mg/mL).



Precisão

Os procedimentos propiciaram respostas espectrofotométricas precisas nos dois níveis analisados: repetitividade e precisão intermediária para fração *n*-hexânica. Em relação ao parâmetro repetitividade, os resultados obtidos apresentaram uma média do teor de fitosteróis (g%) de $0,83\% \pm 0,002$ (2,57%), com coeficiente de variação abaixo do valor máximo especificado (BRASIL, 2003).

Na precisão intermediária, foi demonstrado que o método é preciso para análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, estando a variação encontrada dentro dos limites especificados, cujos valores do coeficiente de variação encontraram-se compreendidos entre 1,31% e 2,91% (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados em média do teor de fitosteróis obtidos na precisão intermediária. Desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Analista	Dia	Teor Fitosteróis (g%)	DP	CV%
A	1	0,081	0,002	2,38
A	2	0,84	0,001	1,31
B	1	0,81	0,002	2,91
B	2	0,82	0,002	2,22

Exatidão

A exatidão dos procedimentos foi estimada a partir do ensaio de recuperação. Desta forma, a interferência da matriz sobre a resposta do método foi avaliada sob o aspecto da capacidade de extração dos analitos. De acordo com os dados obtidos, não houve interferência significativa dos procedimentos sobre a recuperação de 101,90 a 103,71% (Tabela 2). A legislação regulamenta que os resultados para a exatidão não devem ser inferiores a 95% (ICH, 2005). Estes dados confirmam que o método de quantificação por espectrofotometria proposto encontra-se em conformidade com a legislação vigente e apresenta confiabilidade dos resultados.

Tabela 2. Resultados em média para exatidão (%) para fração *n*-hexânica de xarope. Desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV%).

Amostra	Recuperação (%)	DP	CV%
Amostra 1	103,71	2,74	2,64
Amostra 2	102,24	3,98	3,89
Amostra 3	101,90	1,42	1,40

Robustez

Neste parâmetro, pequenas e deliberadas variações na metodologia analítica foram avaliadas. A variação do fabricante do solvente (Quimex® e Fmaia®) não apresentou efeitos significativos no teor de fitoesteróis (g%). Assim como para variação de comprimento de onda (623 e 627 nm) (Tabela 3). Os dados obtidos para as fontes de variação em estudo apresentaram-se inferiores a 5%, conforme determinação normativa, atestando, desta forma, a robustez do método (BRASIL, 2003).

Tabela 3. Resultados em média do teor de fitosteróis da robustez, para as fontes de variação marca do solvente e comprimento de onda para leitura das amostras. Desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%).

Fonte de Variação	Teor (g%)	DP	CV%
Solvente			
Quimex ®	0,082	0,002	2,34
Fmaia ®	0,082	0,002	2,87
λ (nm)			
623	0,083	0,0009	1,11
624	0,083	0,0006	0,71
625	0,083	0,0003	0,36
626	0,083	0,0005	0,59
627	0,083	0,0005	0,59

CONCLUSÃO

Os estudos de validação constituem uma exigência da Resolução Diretiva Colegiada, nº 14, de 31 de março de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que visa a normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos como parte essencial das Boas Práticas de Fabricação, de modo a garantir a qualidade de um medicamento (BRASIL, 2004). Para manutenção da qualidade do fitoterápico, é necessário assegurar a coexistência de substâncias com atividade biológica, ou grupos químicos, presentes na espécie. A partir destas considerações, foi possível desenvolver e validar metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para quantificar os fitosteróis presentes em xarope contendo raízes de *A. hispidum*. O método analítico foi validado em 625 nm, apresentando linearidade, com equação da reta $y = 0,0817x + 0,0335$ e coeficiente de determinação 0,9944. Foi considerado robusto de acordo com as fontes de variação analisadas. Assim como, foi possível assegurar a precisão e exatidão do método. Deste modo, o método analítico espectrofotométrico UV-Vis constitui, portanto, uma ferramenta alternativa, útil, de baixo custo e fácil execução no controle de qualidade de fitosteróis totais em xarope de raízes de *A. hispidum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFPE (PIBIC/UFPE), a FACEPE (APQ-1296-12) e ao CNPQ (312537/2009-3, 501834/2010-9, 475216/2011-3, 483870/2011-0) pela concessão de bolsas e pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FRANCA, P. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; LIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 27-30, 2003.

ANDRADE, M.M.F. **Memento farmacêutico**. Maracanaú: Prefeitura Municipal de Maracanaú -Secretaria de Saúde, Setor de Assistência Farmacêutica, p.24, 2000.

ARAÚJO, A.A.S; MERCURI, A.L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.42, n.2, p.269-77, 2006.

ARAÚJO, E.L. ***Acanthospermum hispidum* DC (Asteracea) Validação para fins Farmacêuticos**. 2007.116 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

ARAUJO, E. L.; RANDAU, K.P.; SENA-FILHO, J.G.; MENDONÇA, R.M.; XAVIER, H. S. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.777-784, 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. (2009). <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acesso em 08/12/12.

BOTSARIS, A. **Cresce interesse pela fitoterapia**. Vya estelar: caminhos para o bem-estar integral. Disponível em: <<http://www2.uol.com.br/vyaestelar/plantas.htm>>. Acesso em: 08 dez. 2012.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja)comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.63-67, 2002.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **R.E, nº 899 de 29 de maio de 2003** – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – **RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRIESKORN, C.H.; HOFMANN, H. Beitrag zum Chemismus der Farbreaktion nach Liebermann-Burchard. **Arch. Pharm.**, v.297, p. 37, 1964.

BURCHARD, H. Beitrage zur Kenntnis des Cholesterins. **Chem.Zentralbl.**, v.61, p.25-27, 1890.

BURKE, R.W.; DIAMONDSTONE, B.I.; VELAPOLDI, R.A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. **Clinical Chemistry**, n.20, p.794-801.1974.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 314-319, 2008.

COUTO, R.O.; VALGAS, A.B.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). **Rev Eletr Farm.**, v.6, n.3, p.59-69, 2009.

COOK, R.P. Reactions of Steroids Sulphuric Acid (the with Acetic Anhydride And Liebermann - Burchard Test). **Analyst**, v.86, p. 373-381, 1961.

KENNY, A.P. The Determination of Cholesterol by the Liebermann-Burchard Reaction. **Clinical Laboratorie**, v. 52, p.611-619, 1952.

KIM, E.; GOLDBERG, M.A. Serum cholesterol assay using a stable Liebermann-Burchard reagent. **Clinical Chemistry**, v.12, p.1171-1179, 1969.

MACIEL, S.S.; PAULO, M.Q.; SOUZA, C. O.; SILVA, L.G.; TAVARES, R. R. Efeito broncodilatador do *Acanthospermum hispidum* DC, nos doentes pulmonares

obstrutivos crônicos (DPOC). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.1, n.1/3 p.23-30,1997.

MARLIÉRE, L.D.P.; RIBEIRO, A.Q.; BRANDÃO, M.G.L.; KLEIN, C.H.; ACURCIO, F.A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.754-760, 2008.

MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIM, E.L.C.; ANDRADE LIMA, C.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.111-120, 2004.

MOORE, P.R.; BAUMANN, C.A. Skin sterols I. Colorimetric determination of cholesterol and other sterols in skin. **J. Biol. Chem.**, v.195, p.615–621, 1952.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHAES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos Indios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.169-177, 2005.

RENGER, B. 2000. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. **Journal of Chromatography B**, v.745, p.167-176.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.618-626,2008.

SORENSEN, T.S. The Preparation and Reactions of a homologous series of aliphatic polyenylic cations. **J Am Chem Soc.**, v. 87, p.5075–5084, 1965.

TORRES, A.R.; OLIVEIRA, R.A.G.; DINIZ, M.F.F.M.; ARAUJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: Riscos e Benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v.15, p.373-380, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 308-313, 2008.

VELAPOLDI, R.A.; DIAMONDSTONE, B.I.; BURKE, R.W. Spectral interpretation and kinetic studies of the Fe^{3+} - H_2SO_4 (Zak) Procedure for determination of cholesterol. **Clin Chem**, v.20, p.802-811, 1974.

YODER, L.; THOMAS, B.H. An Antirachitic Sulfonic Acid derivative of cholesterol. **Arch biochem biophys**, v.50, p.113-123, 1954.

ZUMAN, P. A Review of Reactions of Some Sterols in Strongly Acidic Media. **Microchemical Journal**, v.43, p.10-34, 1991.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As raízes pulverizadas de *Acanthospermum hispidum* foram classificadas como pós moderadamente grossos e apresentaram cinzas totais e insolúveis em ácidos adequados quanto aos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia brasileira (2010). Em que pese o teor de umidade residual tenha se mostrado abaixo do limite farmacopéico, é possível inferir sobre sua estabilidade, tendo em vista que instabilidade química e microbiológica está associada a teores acima do especificado. Através da triagem fitoquímica por CCD, foi possível confirmar presença de fitosteróis, sugerindo a adequação destes compostos como marcadores químicos para o controle de qualidade da espécie.

A metodologia desenvolvida por espectrofotometria para quantificação de fitosteróis totais mostrou adequação aos parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03 da ANVISA e International Conference on Harmonization ICH (ICH,1996), mostrando-se disponíveis como técnicas sensíveis, precisas, exatas e robustas. Deste modo, apresentou a confiabilidade requerida para um método analítico, sendo apto para rotina laboratorial, inclusive pela sua simplicidade e baixo custo de execução.

Os resultados obtidos neste trabalho tornaram-se, portanto, importantes no processo de identificação e padronização de parâmetros de qualidade para raízes de *A. hispidum*, garantido a o desenvolvimento e produção de fitoterápicos seguros e eficazes.

REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, A.; SADIQ, Y.; GABRIEL, O. A.; ABDULKADIR, U. Z.; EZZELDIN, M. A. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p.27–30, 2005.

ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, n.935, v. 1–2, p.173–201, 2001.

ADU, F.; GBEDEMA, S.Y.; AKANWARIWIAK, W. G.; ANNAN, K.; BOAMAH, V.E. The effects of *Acanthospermum hispidum* extract on the Antibacterial activity of Amoxicillin and Ciprofloxacin. **Hygeia Journal for Drugs and Medicines**, v.3 ,n.1, p. 58- 63, 2011.

AGRA, M. F.; FRANCA, P. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007.

ARAUJO, E.L.; PISCIOTTANO, M.N.C.; MAIA, M.B.; AFI ATPOUR, P.; SOUZA, M.A.; REGO, M.L.; WANDERLEY, M.M.C.; SILVA, N.H. Avaliação fitoquímica e farmacológica preliminar do *Acanthospermum hispidum* (Espinho de Cigano). **Biologica Brasilica**, v. 1, n.1, p.181, 1989.

ARAUJO, E.L.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S. Plantas medicinais em destaque: *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae). **Racine**, v. 66, p. 32-34, 2002.

ARAÚJO, E.L. ***Acanthospermum hispidum* DC (Asteracea) Validação para fins Farmacêuticos**. 2007.116 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

ARAÚJO, E. L.; RANDAU, K.P.; SENA-FILHO, J.G.; MENDONÇA, R.M.; XAVIER, H. S. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 777-784, 2008.

ARENA, M. E. ; CARTAGENA, E. ; NADIA, G.; MARIO, B.; JUAN, C.V.; ALICIA, B. In vivo and in vitro antibacterial activity of acanthospermal B, a sesquiterpene lactone isolated from *Acanthospermum hispidum*. **Phytotherapy Research**, v.25, n.4, p. 597–602, 2011.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 2127-2130, 2000.

AWAD, A.B.; FINK, C.S.; WILLIAMS, H.; KIM, U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. **European Journal of Cancer Prevention**., v.10, p.507–513, 2001.

AWAD, A.B.; CHINNAM, M.; FINK, C.S.; BRADFORD, P.G.; Targeting ceramide by dietary means to stimulate apoptosis in tumor cells. **Current Topics in Nutraceutical Research**., v.2, p.93-100, 2004.

BARROS, J.F.P.; NAPOLEAO, E. **Ewé òrìsà: uso litúrgico e terapêutico dos vegetais nas casas de candomblé Jêje Nagô**. Bertrand ,Brasil, 2.ed,. 2003.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vicoso/MG: Imprensa Universitária, v. 3, p. 237-314, 1991.

BARTOS, J.; PESEZ, M. Colorimetric and fluorimetric analysis of steroids. Academic, London. 1976.

BERGSTRÖM, S.; WINTERSTEINER, O. Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution – VI. The influence of esterification and of constitutional factors. **Journal of Biological Chemistry**, v.145, n.1, p. 327-333, 1942.

BERO, J.; HANNAERT, V.; CHATAIGNÉ, G.;HÉRENT. M.F.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in

traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 998-1002, 2011.

BOHLMAN, F.; JAKUPOVIC, J.; ZDERO, C.; KING, R.M. Neue melampolide und *cis*, *cis*-germacranolide aus vertretern der subtribus Melampodiinae. **Phytochemistry**, v.18, p.625-630, 1979.

BOUIC, P.J.D. Sterols/Sterolins: The natural, nontoxic immuno-modulators and their role in the control of rheumatoid arthritis. **The Arthritis Trust Newsletter**, p. 3-6, 1998.

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

BRANDAO, M.; GAVILANES, M.L.; LACA-BUENDIA, J.P. 1986. Plantas daninhas ocorrentes na cultura de trigo (*Triticum aestivum* L) no Estado de Minas Gerais. **XXXVII Congresso Nacional de Botânica**, Minas Gerais, Brasil.

BREMER, K. Asteraceae: Cladistics and classification. Portland: Timber Press, 1994, In: NAKAJIMA, J.N. ; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n.4, 2001.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: Physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, p.217-225, 2008.

BURCHARD, H. **Beitrage zur Kenntnis des Cholesterins**. Chem Zentralbl., v.61, p.25–27, 1890.

BURKARD, I.; RENTSCH, K.M.; VON ECKARDSTEIN, A. Determination of 24S- and 2 hydroxycholesterol in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Lipid Res**. n.45, p. 776–78, 2004.

BURKE, R.W.; DIAMONDSTONE, B.I.; VELAPOLDI, R.A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. **Clinical Chemistry**, n.20, p.794-801.1974.

CARTAGENA, E.; BARDON, A.; CATGALAN, A.N. Germacranolides and a new type of guaianolide from *Acanthospermum hispidum*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1323-1328, 2000.

CAETANO, N.P.; MAIA, B.; AFIATPOUR, P. Avaliação fitoquímica, microbiológica e farmacológica preliminar do *Acanthospermum hispidum* (espinho de cigano). **XI Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, 1990.

CHAKRABORTY, A. K.; GAIKWAD, A. V.; SINGH, K. B. Phytopharmacological review on *Acanthospermum hispidum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, n.1, p. 144-148, 2012.

CHO, E.; SPIEGELMAN, D.; HUNTER, D.J.; CHEN, W.Y.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.; WILLETT, W.C. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.95, p.1079–1085, 2003.

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

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**, Laboratório Clínico Silva Araújo: Rio de Janeiro. p.288, 1942.

CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Nacional. Reimpressao MEC/ IBAMA, v.6., 1978.

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

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1996.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1964.

DEEPA, N.; RAJENDRAN, N.N. Anti-tumor Activity of *Acanthospermum hispidum* DC on Dalton Ascites Lymphoma in Mice. **Natural Product Sciences**, v.13, n.3, p. 234-240, 2007.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products**. John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 1997.

EDEWOR, T. I.; OLAJIRE, A. A. Two Flavones from *Acanthospermum hispidum* DC and their antibacterial activity. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 132-141, 2011.

EL KAMALI, H.M.; EL KHALIFA, K.F. Treatment of malaria through herbal drugs in the central Sudan. **Fitoterapia**, v.68, p. 527- 528, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: **Atheneu**. 2010.

FERNANDES, A.J.D.; FERREIRA, M.R.A.; RANDAU, K.P.; SOARES, L.A.L. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-7, 2012.

FERRO, P.V.; HAM, A. B. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v. 33, p. 545, 1960.

FIRESTONE, D. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed., Champaign: **AOCS**, 2004.

FLEISCHER, T.C.; AMEADE, E.P.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**, v.74, p.130-132, 2003.

HALL, D.W.; VANDIVER, V.V.; FERRELL, J.A. **Bristly Starbur, *Acanthospermum hispidum* DC.** University of Florida IFAS Extension, 1989.

HAREKRISHNA, R.; ANUP, C.; SATYABRATA, B.; BHABANI S. N.; SRUTI RANJAN, M.; ELLAIAH, P. Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2, n.5, p. 217-221, 2010.

HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. A Família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**. v.59, n.4, p.687-749. 2009.

HERZ, W.; KALYANARAMA, P.S. Acanthospermal A and acanthospermal B, two new melampolides from *Acanthospermum hispidum* species. **J Org Chem.**, v.40, p.3486-3491, 1975.

HOLM, L.D.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHO, J.; HERBERGER, J. **World weeds: natural histories and distribution.** John Wiley & Sons. p.1129, 1997.

HUSSAIN, R.A.; LIN YM, POREDA LD, BORDASE E, CHUNG BS, PEZZETO JM, SOEJARTO DD, KINGHORN AD. Plant derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.28, p.103-15, 1990.

ICH. **Harmonised Tripartie Guideline: Validation of Analytical Procedures:** Text and Methodology, 1996.

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

JAKUPOVIC, J.; BARUAH, R.N.; BOHLMANN, F. Further acanthospermolides from *Acanthospermum hispidum*. **Planta Medica.**, v. 2, p.154-155, 1986.

JOLY, C. A. Flooding tolerance in tropical trees. **In Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry.** (M.B.Jackson, D.D. Davies & H. Lambers, eds.). SBP Academic Publishing, The Hague, p 23-34. 1991

JONES, P.J.; RAEINI-SARJAZ,M.; NTANIOS, F.Y. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytotanol esters. **Journal of Lipid Research.**, v.41, p.697-704, 2000.

KOMAROVA, N.I.; ROGACHEV, A.D.; CHERNYAK, E.I.; MOROZOV, S.V.; FOMENKO, V.V.; SALAKHUTDINOV, N.F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chem Nat Compd.** v.45, p.26-29, 2009.

KISSMANN, K.G. **Invasoras na cultura da soja.** São Paulo: Basf – Divulgação Agronômica, v. 1, p. 88,1978.

KUKSIS, A. Plasma non-cholesterol sterols. **J. Chromatogr. A.** v.935, p. 203–236. 2001.

KUMAR R, SINGH P, SINGH H. Development of colorimetric method for the analysis of pharmaceutical formulation containing both ofloxacin and cefixime. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p.178-179, 2011.

LAGARDA, M.J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.5, p. 1486-1496, 2006.

LAW, M.R. Plant sterol and stanol margarines and health. **Western Journal of Medicine**, v.173, p. 43-47, 2000.

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

LEITÃO FILHO, H. F., ARANHA, C., BACCHI, O. **Plantas invasoras de culturas no estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, v.1, p. 1-291, 1972.

LEMBCKE, J.; CEGLAREK, U.; FIEDLER, G.M.; BAUMANN, S.; LEICHTLE, A.; THIERY, J. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v.46, n.1, p.21- 6. 2005.

LEMONICA, I.P.; ALVARENGA, C.M.D. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC and *Cajanus cajari* (L) Millps in pregnant rats. **Journal Ethnopharmacol.** v.43, p. 39-44, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de LODI, W.R. e SIMÕES, A.A. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p. Tradução de: Principles of biochemistry.

LI, X.Z.; MA, D.; LIVERMORE, D.M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactamase resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.8, p. 1742-1752, 1994.

LIEBERMANN, C. Ueber das Oxychinoterpen. **Chemische Berichte**. v.18, p.1803–1809, 1885.

LIU, S.; RUAN, H. A highly sensitive quantification of phytosterols through an inexpensive derivatization. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.166, p.18-25, 2013.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP, 4ª Ed, p.672, 2008.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: São Paulo, 1ª ed 1982, 425p.

MACIEL, S.S.; PAULO, M.Q.; SOUZA, C. O.; SILVA, L.G.; TAVARES, R. R. Efeito broncodilatador do *Acanthospermum hispidum* DC, nos doentes pulmonares

obstrutivos crônicos (DPOC). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.1, n.1-3 p.23-30,1997.

MACLINTYRE, I.; RALSTON, M. Direct determination of serum cholesterol **Biochemical Journal**, v. 56, n.43, 1954.

MATHUR, S. B.; BEJARANE, L. B. Isolation of Triacolin A, N-Butyl Eicosanol and N-Heptacosanol from *Acanthospermum hispidum*, **Phytochemistry**. v. 15, p. 2026, 1976.

MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. . Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata* , **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2013.

MATOS, F.J.A. 1997. **O Formulário Fitoterápico do Professor Dias da Rocha**. 2. ed.Fortaleza: Editora UFC.

MARTIN, R.J. Mode of action of anthelmintic drugs. **Veterinary Journal**., v.154, p. 11-34, 1997.

MENUT, C.; MOLANGUI, T.; LAMATY, G. Aromatic plants of tropical central africa. Xxiv volatile constituents of *Acanthospermum hispidum* DC from the Congo. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p.589-592, 1995.

MESSINA, M.; BARNES, S.; The role of soy products in reducing the risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**., v.83, p.541–546, 1991.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHAES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 169-177, 2005.

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses.**Progress in Lipid Research**, v.41, p.457-500, 2002.

MOTHANA, R.A.; LINDEQUIST, U.; GRUENERT, R.; BEDNARSKI, P.J. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. **BMC Complem Altern. M** . v .9, p.7, 2009.

NAIR, A.G.R.; SUBRAMANIAN, S.S.; BOHLMANN, F. Naturally occurring terpene derivatives. 79: A new diterpene galactoside from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry**, v.15, p. 1776-1778, 1976.

NAIR, A.G.R.; RAO, S.A., VOIRIN, B.; FAVRE, F.; BON-VIN, J. Polyphenolic Compounds from Leaves of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**, v.56, n.4, p. 240-250, 1985.

NOGUEIRA, G.C., BRAGAGNOLO, N. Utilização de um método enzimático para determinação de colesterol em ovo em pó. **Anais XVI Cong. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 1, p. 431-434, 1998.

NORMÉN, A. L.; BRANTS, H. A. M.; VOORRIPS, L. E.; ANDERSSON, H. A.; BRANDT, P. A.; GOLDBOHN, R. A. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**., v.74, p. 141-148, 2001.

NOVY, J.W. Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. **J Ethnopharmacol.**, v. 55, p.119-126, 1997.

ODEBIYI, O.O.; SOFOWORA, E.A. Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants II. **Lloydia**, v. 41, p. 234-246, 1978.

OLIVEIRA, A.B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa Paradisiaca* L., Musaceae**. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

OVESNÁ, Z.; VACHÁ, L.; KOVÁ, A.; HORVATHOVÁ, K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/ chemopreventive effects. **Neoplasma**, v. 51, p.407- 414, 2004.

PEARSON, S.; STERN, S.; MCGAVACK, T.H. A rapid procedure for the determination of serum cholesterol. **J. Clin. Endocrinol.**, v.12, p.1245, 1952.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Analysis of steryl glucosides in foods dietary supplements by solid-phase extraction and gas chromatography. **J. Food Lipids**, v.2, p.124–140, 2005.

PIIRONEN, V.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. Natural Sources of Dietary Plant Sterols **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 619-624, 2000.

RAMACHANDRAM, N.A.G.; SUBRAMANA, S.S.; BOHLMANN, F. A new diterpene galactoside from *Acanthospermum hispidum*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1776-1778, 1976.

ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants**. Massachusetts : Cordus Press, 6 ed. 151-153, 1991.

SANON S, AZAS N, GASQUET M, OLLIVIER E, MAHIOU V, BARRO N, CUZIN-OUATTARA N, TRAORE AS, ESPOSITO F, BALANSARD G, TIMON-DAVID P Antiplasmodial activity of alkaloid extracts 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.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; WALLE, L.V.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDER-BEALE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v.23, p.2861–2874, 2004.

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

SARKER, S. D. e NAHAR, L. **Chemistry for Pharmacy Students : General Organic and Natural Product Chemistry**. John Wiley e Sons, Ltd. 2007.

SÄYNÄJOKI, S.; SUNDBERG, S.; SOUPAS, L.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.80, p. 415-421, 2003.

SHEN, C. J.; CHEN, I. S.; SHEPPARD, A. J. Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. **Journal of American Organization of Analytical Chemistry**, v.65, p.1222–1224, 1982.

SILVA, K.G.H.; JÚNIOR-XAVIER, F.H.; FARIAS, I.E.G.; SILVA, A.K.A.; NETO, J.A. CALDAS; SOUZA, L.C.A.; SANTIAGO, R.R.; JÚNIOR-ALEXANDRINO, F.; JÚNIOR-NAGASHIMA, T.; SOARES, L.A.L.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; EGITO, E.S.T. Stationary cuvette: a new approach to obtaining analytical curves by UV-VIS spectrophotometry. **Phytochemical Analysis**, v.20, p. 265-271, 2009.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 17 ed. New York : John Wiley & Sons, Inc. p. 937-941, 1156-1157, 1998.

SOUSA F. F.; ALMEIDA, L.S.; ANDRADE L. O.; QUEIROZ, M. F. Identificação de plantas espontâneas com propriedades terapêuticas em área cultivada com *Jatropha* Sp., **Revista Verde**, Mossoró, RN , Brasil, v.6, n.4, p. 258 - 262, 2011.

STUDER, J.; PURDIE, N.; KROUSE, J.A. 2003. Friedel-Crafts acylation as a quality control assay for steroids. **Appl Spectrosc.**, n.57, p.791–796.

SUMMERFIELD, A.; GUNTHER, M.K.; THOMAS C.; METTENLEITER, B.; HANNS-JOACHIM, R.; ARMIN, S. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. **Antiviral Research**, v.36, p.55–62, 1997.

SUMMERFIELD, A.; SAALMULLER, A. Interleukin-2 dependent selective activation of porcine Gamma-felta T lymphocytes by an extract from the leaves of

Acanthospermum hispidum. **International Journal of Immunopharmacology**, v.20, p.85-98, 1998.

TORRES, A.R.; OLIVEIRA, R.A.G.; DINIZ, M.F.F.M.; ARAUJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de Joao Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.373-380, 2005.

---- **VIA RURAL**. Disponível em: [http/ /www.viarural.com.ar/](http://www.viarural.com.ar/). Acesso em 24.06.2007.

XAVIER, H.S.; ARAUJO, E.L. Avaliação cromatográfica de amostras de extratos fluidos de *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) cultivado e de ocorrência espontânea. **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Florianópolis, Brasil,1998.

XIONG, Q.; RUAN, B.; WHITBY, F.G.; TUOHY, R.P.; BELANGER, T.L.; KELLEY, R.I.; WILSON, W.K.; JUNIOR-SCHROEPFER, G.J. A colorimetric assay for 7-dehydrocholesterol with potential application to screening for Smith-Lemli-Opitz syndrome. **Chem. Phys. Lipids**, v.115, p.1–15, 2002.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v.42, p.87–96, 2007.

ZLATAKIS, A.; ZAK, B.; BOYLE, A. J. A new method for the direct determination of serum cholesterol. **J. Lab. Clin. Med.**, v.41, p. 486, 1953.