

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PPGCF

JAILMA LETÍCIA MARQUES TEMOTEO

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DA
CAVALINHA (*Equisetum arvense*)**

Maceió

2017

JAILMA LETÍCIA MARQUES TEMOTEO

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DA
CAVALINHA (*Equisetum arvense*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), a fim de aprovação para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura.

Coorientador: Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas

Maceió

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

T282a Temoteo, Jailma Letícia Marques.
Avaliação fitoquímica, microbiológica e citotóxica da cavalinha (*Equisetum arvense*) / Jailma Letícia Marques Temoteo. - 2017.
80 f.: il.

Orientadora: Maria Aline Barros Fidelis de Moura.
Coorientador: Johnnatan Duarte de Freitas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 58-64.
Apêndices: f. 65-80.

1. *Equisetum arvense*. 2. Plantas medicinais - Cavalinha. 3. Antimicrobiana – Atividade. 4. Citotoxicidade. 5. Antioxidante. I. Título.

CDU: 615.3:633.88

FOLHA DE APROVAÇÃO

JAILMA LETÍCIA MARQUES TEMOTEO

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DA CAVALINHA (*Equisetum arvense*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), e aprovada em 04 de maio de 2017.



Prof.^a. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura - UFAL (Orientadora)

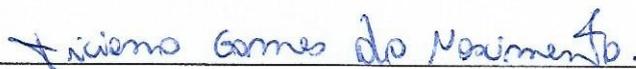


Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas – IFAL (Coorientador)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Alan John Duarte de Freitas – IFAL



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento – UFAL



Prof. Dr. José Rui Machado Reys – UFAL

A Deus,
a meus pais,
a meu irmão,
a meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida, por toda graça recebida e por sempre me guiar por caminhos seguros.

Agradeço aos meus pais, Jailda e Nivaldo, por todo ensinamento, amor, carinho, esforço, dedicação, compreensão, apoio e incentivo.

Ao meu irmão, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo.

A minha família, de modo geral, por cada palavra de incentivo e apoio, e cada gesto de carinho.

A Prof^ª. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura, pela orientação durante o mestrado, pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo, por todos os ensinamentos partilhados e, principalmente, por ser essa pessoa e profissional maravilhosa.

Ao Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas, pela coorientação concedida, apoio, incentivo e ensinamentos partilhados e também por ter permitido, como coordenador da área de Química do IFAL – Campus Maceió, a realização de uma parte de meus experimentos nas dependências dos laboratórios desta área.

Ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento, pela contribuição científica, apoio, incentivo, ensinamentos partilhados e pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Alan John Duarte de Freitas, pela participação na banca examinadora e também pelo apoio, incentivo e conhecimento partilhado.

Ao Prof. Dr. José Rui Machado Reys, pela participação na banca examinadora e conhecimento partilhado.

Ao Prof. Ms. Demetrius Morilla Pereira, por toda colaboração e contribuição científica, apoio, incentivo e ensinamentos partilhados, e também por ter viabilizado a parceria entre a UFAL e o IFAL – Campus Maceió, visto que é o coordenador do Departamento de Extensão, Pesquisa e Pós-Graduação (DEPP) do citado campus.

A Prof^ª. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira e ao seu doutorando Rafael Jorge Melo de Omena, pela contribuição científica e ensinamentos partilhados no presente estudo.

A minha amiga Eleine Batinga, pela amizade e carinho, pela parceria na pesquisa realizada nos laboratórios do IFAL – Campus Maceió, apoio e incentivo.

A todos os meus amigos por terem compreendido a minha ausência em alguns momentos, por sempre me incentivarem e apoiarem, pela amizade e carinho.

A CAPES pela bolsa concedida, incentivando o presente estudo, contribuindo, assim, para que o mesmo acontecesse.

Enfim, obrigada a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que mais esse passo de minha vida fosse concluído com sucesso.

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará.”

(Salmo 23:1)

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”

(I Samuel 7:12)

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

RESUMO

As plantas medicinais são, há séculos, usadas na medicina popular, prática essa passada entre gerações. São ricas em substâncias ativas, que podem levar a descoberta de um novo fitoterápico e até mesmo a descoberta de um novo fármaco. A *Equisetum arvense*, conhecida popularmente por cavalinha e presente na RENISUS, é uma planta rica em silício e constituída também por taninos e polifenóis, sendo utilizada na terapêutica como diurética, porém também tem ação cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Considerando o atual panorama da resistência microbiana, estudos que se propõem a avaliar atividade antimicrobiana, como também citotóxica, são de grande relevância. O objetivo deste trabalho é avaliar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do extrato e frações de *E. arvense*. O extrato bruto foi obtido através da maceração da cavalinha em etanol, enquanto que as frações foram por meio da maceração da cavalinha em solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), e em seguida concentrados em evaporador rotatório. O perfil fenólico foi composto pelo teor de fenóis por Folin-Ciocalteu, flavonóides totais e identificação de substâncias fenólicas por CLAE com detector UV-DAD; a atividade antioxidante foi verificada por DPPH; a avaliação da atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em disco, usando cepas ATCC de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; e, a citotoxicidade foi realizada em cultura de macrófagos de linhagem J774 e determinada pelo ensaio de Elisa a 530 nm, usando como indicador de morte celular o MTT. Os resultados obtidos comprovaram a presença de compostos fenólicos na cavalinha, como ácidos fenólicos e flavonóides, resultando em um bom teor de fenóis e flavonóides em seu extrato e frações e também em uma alta atividade antioxidante, sendo esta maior que 90% para a fração acetato de etila. Em relação a atividade antimicrobiana, a fração de acetato de etila foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto que a fração clorofórmica foi capaz de inibir também o crescimento de *E. coli*, sendo esta inibição dependente da concentração da fração. Quanto a citotoxicidade, as frações de hexano e metanol da planta apresentou CL_{50} de 67,66 e 74,33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo estas frações as mais citotóxicas para os macrófagos de linhagem J774, enquanto que o extrato bruto etanólico e as frações clorofórmica e de acetato de etila apresentaram CL_{50} maior que 100 $\mu\text{g/mL}$. Logo, a fração acetato de etila se destacou, por ser a fração com maior teor de fenóis e flavonóides, resultando em uma alta atividade antioxidante, além de conseguir inibir o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando utilizado em concentração de 500 mg/mL , e não apresentar citotoxicidade significativa, não lesando significativamente as células. Ressalta-se, então, que a cavalinha possui bioatividade com função farmacológica a depender de sua concentração, entretanto é uma planta e devido a grande diversidade de seus constituintes também pode exibir certa toxicidade.

Palavras-chaves: *Equisetum arvense*. Cavalinha. Antioxidante. Antimicrobiana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Medicinal plants have been used in popular medicine for centuries, a practice that has been practiced between generations. They are rich in active substances, which can lead to the discovery of a new herbal remedy and even the discovery of a new drug. The *Equisetum arvense*, popularly known as horsetail and present in RENISUS is a plant rich in silicon and also consisting of polyphenols and tannins, being used in therapy as diuretic, but also has a healing, antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial action. Considering the current panorama of microbial resistance, studies that are proposed to evaluate antimicrobial activity, as well as cytotoxic, are of great relevance. The objective of the present work is to evaluate the phytochemical profile, antimicrobial activity and the cytotoxicity of the extract and fractions of *E. arvense*. The gross extract was obtained by maceration of the horsetail in ethanol, while the fractions were by maceration of the horsetail in solvents of different polarities (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol), and then concentrated in a rotary evaporator. The phenolic profile was composed by the phenol content by Folin-Ciocalteu, total flavonoids and identification of phenolic substances by HPLC with UV-DAD detector; the antioxidant activity was verified by DPPH; the evaluation of the antimicrobial activity was verified by the disc diffusion method using ATCC strains of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*; and, cytotoxicity was performed on J774 lineage macrophages and determined by the Elisa assay at 530 nm using MTT as the cell death indicator. The results obtained showed the presence of phenolic compounds in the horsetail, such as phenolic acids and flavonoids, resulting in a good content of phenols and flavonoids in its extract and fractions and also in a high antioxidant activity, being this greater than 90% for the ethyl acetate fraction. In relation to the antimicrobial activity, the ethyl acetate fraction was able to inhibit the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, while the chloroform fraction was able to inhibit the growth of *E. coli* as well, being this concentration dependent inhibition of the fraction. As for cytotoxicity, the hexane and methanol fractions of the plant presented LC₅₀ of 67,66 and 74,33 µg/mL, respectively, these fractions being the most cytotoxic for J774 lineage macrophages, whereas gross ethanolic extract and fractions chloroform and ethyl acetate showed LC₅₀ greater than 100 µg/mL. Therefore, the ethyl acetate fraction was highlighted, being the fraction with higher content of phenols and flavonoids, resulting in a high antioxidant activity, besides being able to inhibit the growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* when used in concentration of 500 mg / mL, and did not present significant cytotoxicity, without significantly damaging the cells. It is emphasized, then, that the horsetail has bioactivity with pharmacological function depending on its concentration, however it is a plant and due to the great diversity of its constituents may also exhibit certain toxicity.

Keywords: *Equisetum arvense*. Horsetail. Antioxidant. Antimicrobial. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Equisetum arvense</i> L.....	20
Figura 2 - Exemplos de compostos fenólicos simples, ácido gálico (a), e complexo, epicatequina-(4 β →6)-catequina (b).....	23
Figura 3 - Reação do ácido gálico (composto fenólico) com molibdênio (componente do reagente Folin-Ciocalteu).	24
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonóides.....	24
Figura 5 - Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	25
Figura 6 - Método de difusão em disco para determinação de atividade antimicrobiana.	29
Figura 7 - Droga vegetal cavalinha (a) e tamisador (b).....	31
Figura 8 - Esquema da maceração da <i>Equisetum arvense</i> para obtenção do extrato bruto e das frações.	32
Figura 9 - Esquema descrevendo a análise do teor de fenóis totais.....	34
Figura 10 - Esquema descrevendo a análise de teor de flavonóides.....	35
Figura 11 - Esquema da análise de identificação de polifenóis por CLAE.	36
Figura 12 - Esquema descrevendo a análise de atividade antioxidante.	37
Figura 13 - Esquema da metodologia de crescimento bacteriano.	39
Figura 14 - Esquema da análise de difusão em disco de papel.....	40
Figura 15 - Esquema do ensaio de citotoxicidade por MTT.....	41
Figura 16 - Cromatogramas em 254 nm (A) e 365 nm (B) identificando os compostos polifenólicos.	47
Figura 17 - Placas de <i>E. coli</i> com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.	48
Figura 18 - Placas de <i>S. aureus</i> com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.	50
Figura 19 - Placas de <i>P. aeruginosa</i> com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.	51
Figura 20 - Teste citotóxico de MTT para o extrato bruto e frações da <i>Equisetum arvense</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etiquetas das embalagens das cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , mostrando a cepa, o lote e a validade.	38
Tabela 2 - Massa (g) e rendimento (%) do extrato e frações.	42
Tabela 3 - Teor de fenóis totais em diferentes concentrações do extrato e frações.	43
Tabela 4 - Teor de flavonóides totais do extrato e frações de cavalinha em diferentes concentrações.	45
Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato e frações de cavalinha e do Trolox em diferentes concentrações.	46
Tabela 6 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a <i>E. coli</i>	49
Tabela 7 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a <i>S. aureus</i>	50
Tabela 8 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabela 9 - Dose letal para 50% da população (CL ₅₀) e efeito citotóxico máximo do extrato bruto e frações da cavalinha.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>Apud</i>	Citado por
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BaSO ₄	Sulfato de bário
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL ₅₀	Dose letal para 50% da população
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DAD	Detector de arranjo de diodo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
<i>E. arvense</i>	<i>Equisetum arvense</i>
<i>E. bogotense</i>	<i>Equisetum bogotense</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. fluviatile</i>	<i>Equisetum fluviatile</i>
<i>E. giganteum</i>	<i>Equisetum giganteum</i>
<i>E. hyemale</i>	<i>Equisetum hyemale</i>
<i>E. myriochaetum</i>	<i>Equisetum myriochaetum</i>
<i>E. palustre</i>	<i>Equisetum palustre</i>
E.P.M.	Erro Padrão da Média
<i>E. pyramidale</i>	<i>Equisetum pyramidale</i>

EQ	Equivalente de quercetina
et al.	Entre outros
g	Gramas
GN	Gram-negativo
h	Hora
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IFAL	Instituto Federal de Alagoas
ITU	Infecções do trato urinário
Kgf/cm ²	Kilograma força por centímetro quadrado
Lafa	Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentos
LAFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
m _{droga}	Massa da droga vegetal
m _{extrato/fração}	Massa do(a) extrato/fração
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mm/μm	Milímetro por micrômetro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mol/L	Mol por litro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
R%	Rendimento em porcentagem
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.d.	Sem data
SFB	Soro Fetal Bovino
sp.	Espécies
SUS	Sistema Único de Saúde
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UV	Ultravioleta
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.1	Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	Plantas Medicinais.....	18
3.2	<i>Equisetum</i> sp.....	19
3.2.1	<i>Equisetum arvense</i> L.	20
3.3	Extração de Compostos Ativos.....	21
3.3.1	Extração por maceração.....	21
3.4	Perfil Fitoquímico	22
3.4.1	Cromatografia.....	22
3.4.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	22
3.4.2	Teor de fenóis totais	23
3.4.3	Teor de flavonóides totais	24
3.5	Atividade Antioxidante	25
3.6	Atividade Antimicrobiana	25
3.6.1	Microrganismos	26
3.6.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.6.1.2	<i>Escherichia coli</i>	27
3.6.1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.6.2	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	28
3.6.2.1	Método de difusão em disco	28
3.7	Citotoxicidade	29
3.7.1	Método de MTT	29
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Preparação da Droga Vegetal <i>Equisetum arvense</i>	31
4.2	Preparação do Extrato Bruto e Frações da <i>Equisetum arvense</i>	32
4.3	Perfil Fitoquímico	33
4.3.1	Diluição do extrato e frações	33
4.3.2	Teor de fenóis totais	33
4.3.3	Determinação de flavonóides totais.....	34

4.3.4	Identificação de compostos polifenólicos através de CLAE	35
4.4	Atividade antioxidante por DPPH	36
4.5	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana	37
4.5.1	Diluição do extrato bruto e frações	37
4.5.2	Preparação do inóculo	37
4.5.2.1	Meio caldo triptona de soja (TSB)	37
4.5.2.2	Meio ágar Mueller-Hinton.....	38
4.5.2.3	Ativação das cepas das bactérias	38
4.5.2.4	Método do crescimento	38
4.5.2.4.1	Solução de McFarland 0,5	39
4.5.3	Método por difusão em disco de papel.....	39
4.6	Ensaio Citotóxico por MTT	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Rendimentos do extrato bruto e das frações	42
5.2	Teor de fenóis totais.....	42
5.3	Determinação de flavonóides totais	44
5.4	Atividade antioxidante por DPPH	45
5.5	Identificação de compostos polifenólicos através de CLAE	46
5.6	Teste de Sensibilidade por Difusão em Disco de Papel	47
5.7	Ensaio citotóxico por MTT	52
6	CONCLUSÕES.....	56
7	PERSPECTIVAS.....	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICES	65
	Apêndice A - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido clorogênico.....	65
	Apêndice B - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido p-coumárico	67
	Apêndice C - Cromatograma e espectro UV-DAD da apigenina.....	69
	Apêndice D - Cromatograma e espectro UV-DAD da myricitrina.....	71
	Apêndice E - Cromatograma e espectro UV-DAD da rutina	73
	Apêndice F - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercitrina.....	75
	Apêndice G - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercetina	77
	Apêndice H - Cromatograma e espectro UV-DAD da luteolina	79

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo usadas para fins terapêuticos desde muito tempo devido a sua riqueza em princípios ativos, porém seu uso, assim como o de medicamentos, deve ser realizado com cautela visto que da mesma forma que possui propriedades farmacológicas, também pode ser tóxica a depender da concentração.

As diferentes espécies do gênero *Equisetum* são plantas medicinais de pequeno porte, que lembra os bambus, conhecidas por cavalinha, possuindo propriedades terapêuticas iguais, porém ainda pouco estudadas.

A cavalinha é uma planta que cresce e se alastra facilmente quando plantada em terreno aberto, principalmente, em pastagens, solos úmidos e pantanosos, porém é uma planta tóxica para alguns animais por conter substâncias anti-vitamina B₁ (CARNEIRO, 2012). Sua principal ação farmacológica é a diurética (FERREIRA, 2001), mas sabe-se que também tem ação anti-inflamatória, antioxidante, hemostática (CUNHA, 2008) e antimicrobiana (RADULOVIC, STOJANOVIĆ & PALIĆ, 2006; MILOVANOVIĆ et al., 2007; SINHA, 2012). Entre seus constituintes, estão presentes silício, como substância inorgânica, e flavonóides, alcalóides, saponinas e taninos, como substâncias orgânicas. A espécie mais estudada é a *E. arvense*, sendo esta já relatada no Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e presente na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS).

Geralmente são estudadas em formas de óleo essencial e extratos, sendo ambos ricos em substâncias ativas, que podem ser tóxicas a depender da quantidade. A extração deve ser realizada com solventes de baixa toxicidade e pode ser a quente ou a frio, porém uma das desvantagens da extração a quente é a perda ou degradação de substância ativa volátil, por isso a frio é a mais usada. Entre as técnicas de extração a frio, a mais utilizada é a maceração, onde o solvente extrator é colocado em contato com a amostra em temperatura ambiente por um determinado tempo.

Os metabólitos secundários presentes na planta ou droga vegetal, constituem o perfil fitoquímico, sendo este estudado através de análises por cromatografia e métodos espectrofotométricos (teor de fenóis totais e determinação de flavonóides totais), e responsáveis pelas propriedades farmacológicas, no caso, da cavalinha. Os antioxidantes são responsáveis pelo sequestro de radicais livres, sendo capazes de prevenir tanto o envelhecimento como o câncer, e sua atividade é verificada através do método de DPPH, sendo este também uma técnica espectrofotométrica.

Para se verificar atividade antimicrobiana, testes de sensibilidade devem ser realizados. Entre os testes, os mais citados são o teste de difusão em disco e o de concentração inibitória mínima, sendo o primeiro o recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e padronizado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS), onde para realização necessitam de microrganismo de cepa reconhecida, ou seja, cepa *American Type Culture Collection*, ou simplesmente, ATCC.

Assim como as plantas, os microrganismos também têm uma grande variedade de gêneros e espécies, classificados em Gram-positivos, como o *S. aureus*, ou Gram-negativos, como *E. coli* e *P. aeruginosa*. A *Pseudomonas aeruginosa*, são microrganismos oportunistas, aparecendo, geralmente, em indivíduos de baixa imunidade, sendo mais presentes em infecções hospitalares. Os microrganismos que participam da flora humana, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* também podem causar doenças quando em quantidade exacerbada no corpo. Todo microrganismo pode sofrer mutação ou transferência de genes, e por consequência se tornar resistente a medicamentos antimicrobianos, dificultando o tratamento terapêutico, por isso a importância da descoberta de novos produtos farmacoterapêuticos, sejam ele sintéticos ou naturais.

Já a toxicidade pode ser avaliada, de modo *in vitro*, por meio do método de MTT, que é um teste de citotoxicidade, onde se avalia quanto tóxico um material é a célula, podendo este material ser uma substância isolada, extratos brutos, misturas de compostos etc.

Este trabalho tem por objetivo realizar avaliação fitoquímica, microbiológica e citotóxica do extrato e frações de *Equisetum arvense*, obtidos através da extração com solventes de diferentes polaridades pelo método de maceração.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do extrato e frações de *Equisetum arvense*.

2.1 Específicos

- Realizar a extração dos metabólitos secundários da planta por meio da maceração;
- Identificar compostos polifenólicos presentes no extrato e frações por meio da CLAE;
- Avaliar a atividade antioxidante, teor de fenóis totais e teor de flavonóides totais;
- Analisar a bioatividade do extrato e frações frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, através do método de difusão em disco;
- Avaliar a citotoxicidade pelo método de MTT.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

O Brasil é um país de grande área territorial de rica flora, onde são cultivadas várias espécies de plantas, estando entre estas muitas plantas utilizadas na medicina popular. Algumas destas plantas ainda têm sua ação terapêutica não comprovada cientificamente, podendo até ser desconhecida ou pouco conhecida na sociedade acadêmica, precisando ser mais estudadas, já que delas podem surgir novos fármacos e medicamentos fitoterápicos para cura ou terapia de diversos males.

Planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2011), classificada como fresca, quando coletada no momento de uso, e seca, quando precedida de secagem, sendo esta também conhecida como droga vegetal (BRASIL, 2016b).

Segundo Brasil (2016b), “nosso país detém da maior parcela da biodiversidade mundial, cerca de 15 a 20%, compondo esta biodiversidade estão as plantas que servem de matéria-prima para produção de medicamentos, sejam eles fitoterápicos ou não, e também para remédios caseiros”. Cerca de aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos são sintetizados a partir de plantas medicinais, seja diretamente ou indiretamente (BRASIL, 2012).

A resolução nº 3133 da Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta a importância do uso de plantas medicinais nos sistemas de saúde dos países em desenvolvimento (AKERELE, 1985 *apud* COSENZA, 2010). No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criada para garantir o acesso seguro e a utilização racional destes, atuando juntamente com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de promover instrumentos que fomentem ainda mais as pesquisas sobre os mesmos, de forma a proporcionar o uso sustentável desta biodiversidade e dessas práticas populares e tradicionais como de integralizar o uso tanto de plantas medicinais quanto de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2016b). Diante disso, atualmente as indústrias farmacêuticas têm investido cada vez mais em testes com produtos naturais oriundos de plantas, com a finalidade de tornar menores os custos dos remédios produzidos, de forma que a população com baixa renda tenha mais acesso aos mesmos (HLEBA et al., 2014).

3.2 *Equisetum* sp.

O gênero *Equisetum* é o único representante existente do subfilo Sphenophytina, pertence ao grupo das Pteridophytes, tendo 15 espécies vivas, sendo conhecido popularmente como cavalinha (HUSBY, 2013). Pertencente à família das *Equisetaceae*, também pode ser conhecido por outros nomes populares como rabo-de-cavalo, erva-canudo e lixa vegetal (GUIMARÃES, 2012).

São plantas caracterizadas por ter rizoma longo com a presença de talos aéreos de cor verde acinzentada, subdivididos em nós (CARNEIRO, 2012) e que apesar de não terem folhas, promovem fotossíntese por seus caules e ramos (KISSMANN, 1997 *apud* CARNEIRO, 2012).

É considerada uma planta daninha tóxica para equinos, bovinos e animais domésticos, por conter substâncias antitiamínicas (GUIMARÃES, 2012; CARNEIRO, 2012). Atingem aproximadamente 130 cm de altura, sendo consideradas plantas de pequeno porte (LORENZI, 2000 *apud* GUIMARÃES, 2012). No território brasileiro são encontradas as espécies *E. giganteum*, *E. pyramidale*, *E. hyemale* L., *E. palustre* e *E. arvense*, contendo esta última uma maior quantidade de sílicio, além de ser a espécie mais descrita e utilizada na medicina tradicional (JOLY, 2002, LAERCIO et al., 2007, HOLZHUTER, 2003 *apud* MELLO & BUDEL, s.d.).

Em relação a sua constituição fitoquímica, são plantas que apresentam um alto teor de compostos inorgânicos, como o silício, e também compostos orgânicos, como compostos fenólicos (SAPEI et al., 2007, D'AGOSTINO et al., 1984 e WICHTL, 1994 *apud* CARNEIRO, 2012).

De uma forma mais completa, são plantas constituídas por ácido silícico (10-15%), ácido gálico, resinas, sais de potássio, tiaminas, isoquercitina, luteolina, canferol, saponinas, compostos inorgânicos, triglicerídios, alcalóides, pequena quantidade de óleos, substâncias amargas, taninos e vitamina C (BERTALOT et al., 2010).

Quanto às ações farmacológicas, as espécies do gênero *Equisetum* vêm sendo usada para o tratamento de doenças reumáticas, cálculos renais e demais infecções do trato urinário (GUIMARÃES, 2012), além de ser utilizada na terapêutica de artrite, infecções, úlceras hemorrágicas, tuberculose, como hemostático e cicatrizante (MILOVANOVIĆ et al., 2007). A *E. fluviatile*, *E. hyemale*, *E. giganteum* e *E. bogotense* apresentam atividade diurética e a *E. myriochaetum* tem ação hipoglicemiante em pessoas diabéticas (GUTIÉRREZ, 1985, LEMUS, 1996 & CETTO, 2000 *apud* FERREIRA, 2001).

A cavalinha também já está sendo utilizada, na agricultura, para o controle de fungos em plantações (BERTALOT et al., 2010; CAMATTI-SARTORI et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2015).

3.2.1 *Equisetum arvense* L.

É uma das 15 espécies vivas do gênero *Equisetum*, sendo a mais estudada e a mais utilizada. Originária da Europa, esta espécie se apresenta como uma planta perene, com altura entre 20 e 65 cm, com caules esporíferos sobre o mesmo rizoma, simples, avermelhados e que apresentam uma espiga oblonga que desaparece no verão (RODRIGUES et al., 2011) (Figura 1). Apesar de sua origem europeia, esta planta é cultivada no Brasil e em diversos outros países.

Figura 1 - *Equisetum arvense* L.



Fonte: Ferreira, 2001.

Esta espécie é uma das 71 plantas presentes na RENISUS, tendo potencial para produzir produtos de interesse ao SUS (AGÊNCIA SAÚDE, 2009). Já está descrita na 3ª edição da Farmacopeia Homeopática Brasileira, assim como a *E. hyemale*, e também na 1ª edição do Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira.

Na terapêutica, é considerada um agente anti-inflamatório, antidiabético, antioxidante, antimicrobiano, anti-anêmico, anti-hemorragico, adstringente, diurético, hepatoprotetor, vasorelaxante e cicatrizante, além de ser utilizada em cosméticos, pelo fato de agir como anti-envelhecimento, hidratante, anti-rugas, anti-acne e anti-transpirante (SANDHU, KAUR & CHOPRA, 2010). É também usado para tratar tuberculose e osteoporose (SINHA, 2012).

Segundo Brasil (2016a), a parte usada de *E. arvense* são as folhas e partes aéreas, sendo indicada como diurética, podendo a ingestão crônica diminuir o nível de tiamina e a ação de diurese causar hipocalcemia, porém estudos não-clínicos realizados em ratos mostram que seu extrato hidroalcoólico possui efeito dose-dependente.

3.3 Extração de Compostos Ativos

O processo de extração é o primeiro e mais importante passo no isolamento e purificação dos compostos bioativos a partir da droga vegetal (ĆUJIC et al., 2016).

De acordo com Sonaglio et al. (2007), a extração é uma técnica que retira seletivamente substâncias ou metabólitos secundários, sendo estes princípios ativos, da planta medicinal através do uso de líquidos extratores. A extração é uma operação que pode ser influenciada por fatores como: característica e granulometria do material vegetal, esta quanto menor for mais eficiente será a extração; razão sólido-solvente, devendo o líquido extrator ser o mais seletivo e o menos tóxico possível, porém eficiente; e a metodologia, onde se leva em conta a agitação, temperatura e tempo necessário para ser realizada, eficiência, estabilidade das substâncias extraídas e custo considerável (SONAGLIO et al., 2007; ĆUJIC et al., 2016).

Os métodos de extração são vários e podem ser realizados a frio, como a turbolização, a maceração e a percolação, ou a quente, como infusão, decocção, sob refluxo e em aparelho de Soxhlet (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 2007), tendo cada método suas próprias características, apresentando vantagens e desvantagens, com o objetivo de extrair completamente os compostos bioativos de interesse, sem alterar sua estrutura química (ĆUJIC et al., 2016).

3.3.1 Extração por maceração

É um método realizado em recipiente fechado, onde o líquido extrator fica em contato com a planta, em temperatura ambiente, durante determinado tempo, que sofrem agitação ocasionalmente e sem que haja renovação do líquido extrator (SONAGLIO et al., 2007; NAVARRO, 2005).

De acordo com Sonaglio et al. (2007), o processo de maceração pode sofrer variação, podendo ser uma digestão, que ocorre através de um sistema de aquecimento entre 40 e 60 °C; uma maceração dinâmica, realizada com agitação mecânica constante; e, uma

remaceração, que é quando o método é repetido usando o mesmo material vegetal com renovação, apenas, do meio extrator; onde estas variações têm como objetivo principal tornar a extração mais eficiente.

3.4 Perfil Fitoquímico

Os ensaios fitoquímicos estudam a presença dos constituintes ativos das plantas por meio de vários testes, entre eles cromatografia, teor de fenóis e teor de flavonóides.

3.4.1 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação dos constituintes de uma amostra, onde esse processo se dar pela migração diferencial desses compostos ao interagir com as duas fases, uma móvel e outra estacionária (CECCHI, 2003). É uma técnica analítica, quando serve para identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas, ou preparativa, conhecida também por semi-analítica, quando realiza apenas o isolamento de compostos (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 2007).

Entre os tipos de cromatografia tem-se: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).

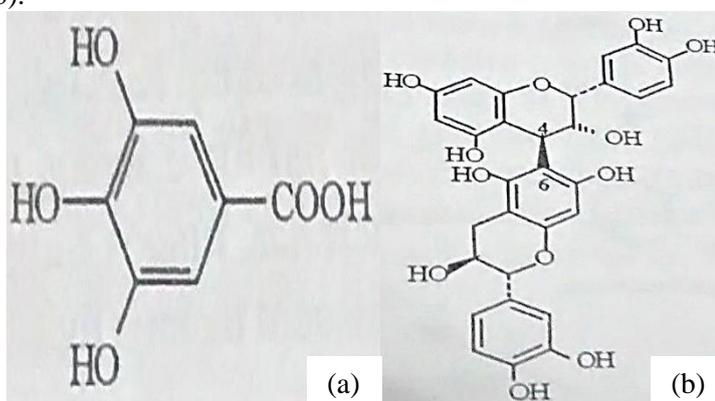
3.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em inglês a *high performance liquid chromatography* tem por sigla HPLC, sendo esta mais comum na comunidade acadêmica. É uma cromatografia em coluna por fase líquida utilizando alta pressão, sendo assim uma otimização da coluna clássica, que faz com que o solvente passe pela coluna a alta pressão, separando os constituintes de uma amostra de forma mais rápida e eficiente (CECCHI, 2003). Essa alta pressão é necessária para que a fase móvel flua numa velocidade razoável, já que a fase estacionária é formada por partículas muito finas, sendo as mais conhecidas alumina e sílica, densamente compactadas, porém, isso deixa a técnica com um custo mais elevado (FALKENBERG, SANTOS E SIMÕES, 2007). Pode ser aplicada a uma grande variedade de produtos, porém a depender do material sua fase móvel e estacionária deve ser modificada. A CLAE pode ser de fase normal, quando sua fase móvel é apolar e a estacionária é polar, ou de fase reversa, quando fase móvel é polar e a estacionária é apolar (FALKENBERG, SANTOS & SIMÕES, 2007), onde o uso tanto da fase reversa quanto da normal irá depender do material que está se querendo separar ou identificar.

3.4.2 Teor de fenóis totais

Os compostos fenólicos possuem estruturas simples e complexas (Figura 2), apresentando pelo menos um anel aromático, onde o hidrogênio é substituído pelo grupamento hidroxila; reativos quimicamente e solúveis em água e solventes orgânicos polares (CARVALHO, GOSMANN & SCHENKEL, 2007), entre os quais estão os taninos, flavonóides e ácidos fenólicos. Têm sido apontados como os responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória.

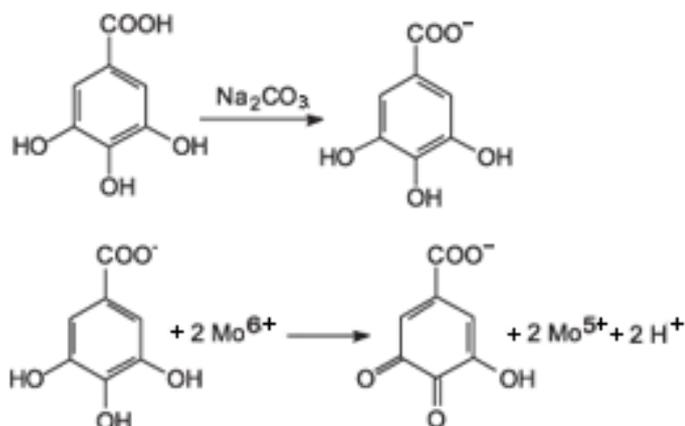
Figura 2 – Exemplos de compostos fenólicos simples, ácido gálico (a), e complexo, epicatequina-(4 β →6)-catequina (b).



Fonte: Santos & De Mello, 2007; Carvalho, Gosmann & Schenkel, 2007.

A determinação do teor de fenóis totais ocorre em meio alcalino, utilizando uma solução de carbonato de sódio a 20% ou saturada e o reagente Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu, onde as hidroxilas fenólicas reduzem o ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico, formando um complexo molibdênio-tungstênio (Figura 3) de cor azul que absorve a luz entre os comprimentos de onda de 620 e 740 nm, porém não é um ensaio específico, visto que quantifica compostos fenólicos como um todo (ANGELO & JORGE, 2007).

Figura 3 – Reação do ácido gálico (composto fenólico) com molibdênio (componente do reagente Folin-Ciocalteu).

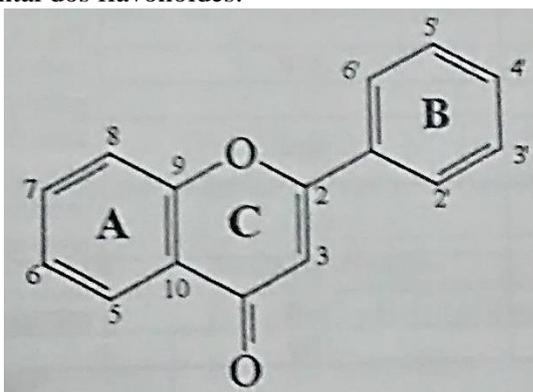


Fonte: De Oliveira et al., 2009.

3.4.3 Teor de flavonóides totais

Os flavonóides (Figura 4) são considerados um dos grupos de maior importância dos compostos fenólicos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007). São compostos de baixo peso molecular e largamente encontrados no reino vegetal na forma de glicosídios ou agliconas (ANGELO & JORGE, 2007). Entre suas atividades farmacológicas estão as ações anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, antitumoral, anti-hemorrágica, hormonais e antimicrobianas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Figura 4 – Núcleo fundamental dos flavonóides.



Fonte: Zuanazzi & Montanha, 2007.

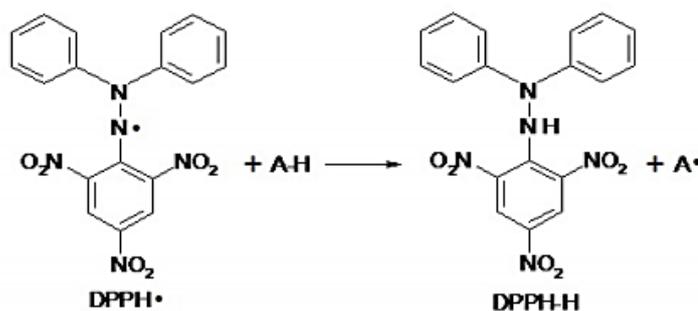
O teor de flavonóides totais é determinado pela reação colorimétrica com cloreto de alumínio (QUEIROZ et al., 2015), baseando-se na medida da absorvância do complexo formado entre o flavonóide e o alumínio que forma compostos de coloração amarelada (SÁ et al., 2012).

3.5 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem, de forma significativa, a oxidação de um substrato oxidável (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989 *apud* TRIVEDI & LAL, 2017), regulando, dessa forma, os radicais livres. Logo, atuam na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007), sendo importantes na redução da oxidação lipídica em animais e vegetais (ANGELO & JORGE, 2007). Os principais compostos que tem por base a capacidade de doar átomos de hidrogênio para radicais livres, são os compostos fenólicos (SINGH et al., 2016), sendo estes também responsáveis por atividades farmacológicas, como antimicrobiana e anti-inflamatória. Pelo fato de sequestrarem os radicais livres, previnem o envelhecimento e diversas doenças, entre elas o câncer, sendo encontrados, além de alimentos naturais, em vários cosméticos e suplementos polivitamínicos.

A determinação da atividade antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) também é um método colorimétrico e espectrofotométrico, onde por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, acontece uma transferência de elétrons fazendo com que o DPPH seja reduzido a difenil-picrilhidrazina (Figura 5), passando da coloração púrpura para amarela (NASCIMENTO et al., 2011).

Figura 5 – Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: Oliveira, 2015.

3.6 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana se faz necessária para descobertas de novos fármacos, sejam elas sintéticas ou não, que tenham capacidade para inibir o crescimento microbiano,

funcionando como bacteriostáticas, ou matar os microrganismos, agindo como bactericidas (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

3.6.1 Microrganismos

Os microrganismos são formas de vida muito pequenas, também conhecidas como micróbios, que não podem ser observados a olho nu, mas sim com o uso de microscópios, onde estão inclusos as bactérias, as arqueobactérias (Archaea), os fungos, os protozoários, os vírus, as algas e alguns parasitas multicelulares de animais, sendo de grande importância para manutenção do equilíbrio dos organismos vivos e dos elementos químicos no meio ambiente, além de ter aplicações comerciais e industriais (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

A resistência aos antibióticos é uma característica natural de diversos ecossistemas microbianos (CROFTS, GASPARRINI & DANTAS, 2017), sendo adquirida através de mutação ou por transferência horizontal de genes (LUKAČIŠINOVÁ & BOLLENBACH, 2017), além de que o uso irracional e a venda indiscriminada de antimicrobianos por muitos anos contribuíram para resistência dos microrganismos a esses medicamentos, gerando o controle dos mesmos pela ANVISA através da retenção de receita.

3.6.1.1 *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram-positivas, em forma de cachos de uva, coagulase positiva, não esporuladas, fermentadoras de manitol e encontradas na pele e nas vias nasais, geralmente, de indivíduos saudáveis, podendo causar de simples infecções até infecções graves, sendo o microrganismo mais patogênico de seu gênero (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012; SANTOS et al., 2007).

Segundo Santos et al. (2007), estas bactérias crescem em ágar ou caldo simples, mas podem crescer também em ágar sangue e, principalmente, em ágar manitol-sal, sendo este último seletivo para tal microrganismo, tendo um pH igual a 7 e uma temperatura de 37 °C, onde suas colônias são arredondadas, lisas e brilhantes, com coloração que varia desde acinzentado até amarelo-ouro, aparecendo depois de 24-48 h da incubação.

São causadores de doenças como impetigo, furúnculo, foliculite simples e carbúnculos, suas toxinas podem causar síndrome da pele escaldada e choque tóxico, além de causar contaminações de alimentos, sendo capazes de produzir infecções alimentares (BALABAN et al., 1998, CARVALHO et al., 2005, CAVALCANTI et al., 2005 & LOWY, 1998 *apud* SANTOS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008).

3.6.1.2 *Escherichia coli*

São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, anaeróbias facultativas, não esporuladas, redutoras de nitrato a nitrito, oxidase-negativa, podem ser móveis ou imóveis, fermentadoras de glicose e lactose, produzindo, assim, ácidos e gases, e são conhecidas também como coliformes fecais (denominação antiga) e coliformes termotolerantes (FRANCO, 2002; MARTINEZ & TRABULSI, 2008). Seu reservatório natural é o trato intestinal humano e ao ser encontrada em água e alimentos indica que estes estão com contaminação fecal (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

Usualmente, os caldos usados enriquecimento seletivo das amostras suspeitas de contaminação por esta bactéria são os caldos EC (*Escherichia coli*) e lauril sulfato, mas ainda pode-se usar os caldos MacConkey e GN (Gram-Negativo); enquanto que os meios seletivos para o plaqueamento são o ágar MacConkey, ágar eosina azul de metileno e ágar bile vermelho violeta (MERK, 1994, VARNAM & ERVANS, 1996, HITCHINS et al., 1992 & HITCHINS et al., 1995 *apud* FRANCO, 2002), devendo estes serem incubados a uma temperatura de 45 °C (FRANCO, 2002).

Esta bactéria é causa de infecções hospitalares e infecções do trato urinário, chamadas também de ITU, em crianças, idosos e gestantes (KARLOWSKY e TRENDS, 2002, PALAU et al., 2011 *apud* KORB et al., 2013), e gastroenterites como a diarreia do viajante, além de doenças graves causadas por ingestão de alimentos contaminados (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

3.6.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

São bactérias patogênicas Gram-negativas, aeróbias, porém podem crescer de forma anaeróbia na presença de nitrato, não fermentadoras e oportunistas, sendo causadoras de infecções graves em indivíduos imunocomprometidos (MATSUYAMA et al., 2015; OWINGS et al., 2016; LINCOPAN & TRABULSI, 2008); ubiquitárias, encontradas em solos, água, alimentos, animais e até hospitais (LINCOPAN & TRABULSI, 2008), ou seja, pode está presente em diversos locais.

Cultura de fácil reconhecimento, pois suas colônias têm odor característico e morfologia variada, podendo ser de aspecto puntiforme, gelatinosa, rugosa ou mucosa, além de formar pigmento característico como piocianina (cor azul) e pioverdina (cor verde brilhante fluorescente) (FERREIRA & PERES LALA, 2010).

São responsáveis por infecções invasivas, capazes de colonizar os pulmões de indivíduos com fibrose cística, além de ser devastador em pacientes queimados (LINCOPAN

& TRABULSI, 2008). Entre as infecções hospitalares mais frequentes causadas por esta espécie de bactéria estão: infecções do trato urinário, pneumonia, peritonites, bacteremias e infecções de cirurgias (FERREIRA & PERES LALA, 2010; LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Ultimamente, tem se tornado cada vez mais resistente a antibióticos, principalmente as cefalosporina de terceira e quarta geração e aos carbapenêmicos (FUENTEFRIA et al., 2008), o que mostra que essa bactéria está adquirindo uma multirresistência e ficando ainda mais forte aos efeitos de antimicrobianos, e isso pode está acontecendo pela prática de uso irracional de medicamentos, principalmente de antibióticos.

3.6.2 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

São testes de grande importância para se avaliar novos antimicrobianos, assim como para estudar epidemiologicamente a resistência dos mesmos, sendo indicados, principalmente, quando não se tem certeza da resistência aos antibióticos geralmente usados para o tratamento de infecção causada por determinada espécie (NCCLS, 2003). Entre os principais testes de sensibilidade aos antimicrobianos, estão os métodos de: difusão em disco, microdiluição em caldo e *E-test* (MIMICA, MENDES & MIMICA, 2008).

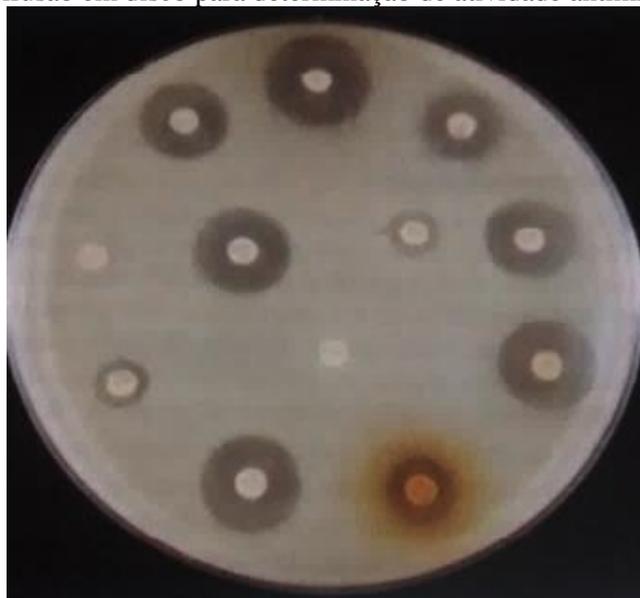
3.6.2.1 Método de difusão em disco

É o teste de sensibilidade mais utilizado na rotina de laboratórios clínicos, sendo o teste estabelecido pelo CLSI (antigo NCCLS), e o indicado pela ANVISA, também conhecido por antibiograma.

Descrito primeiramente por Bauer e colaboradores, é um método qualitativo baseado somente na presença ou ausência de um halo de inibição, como mostra a Figura 6, porém o teste não é aceitável quando não se leva em consideração o tamanho do halo (NCCLS, 2003).

Tem suas vantagens e desvantagens, como qualquer método. Entre as vantagens estão flexibilidade na escolha dos antibióticos, baixo custo, já que para a realização do mesmo é necessário apenas discos comerciais de papel de filtro impregnados com antibióticos em concentração conhecida e placas de Petri com meio ágar, preferencialmente Muller Hinton; fácil interpretação e sua padronização pelo CLSI; e sua desvantagem é que por ser um teste qualitativo, o microrganismo é avaliado apenas como sensível, intermediário ou resistente (MIMICA, MENDES & MIMICA, 2008) conforme definição descrita pelo CLSI.

Figura 6 - Método de difusão em disco para determinação de atividade antimicrobiana.



Fonte: Tortora, Funke & Case, 2012.

3.7 Citotoxicidade

Testes de toxicidade são ensaios que podem revelar riscos associados ao uso de alguma substância ou composto, sendo de grande importância na área da saúde para descoberta de novos fármacos e para usos de plantas medicinais e fitoterápicos (BELLAMAKONDI et al., 2014). Entre os tipos de testes de toxicidade mais importantes está o ensaio de citotoxicidade. Este é de grande importância para determinação de uma possível toxicidade potencial do produto em estudo (HAKIM et al., 2014), podendo ser um composto, substância isolada, fármaco, extrato etc. Sendo assim, o teste de citotoxicidade avalia quanto um produto e seus constituintes podem ser tóxico para uma determinada célula, podendo para isso ser usado diversos métodos, como o método do MTT, método de exclusão do azul de Trypan e método de quantificação de citocinas (OLIVEIRA, 2011).

3.7.1 Método de MTT

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico de fácil reprodução em laboratório, sendo confiável, realizado com o auxílio do corante 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium, que é um pó de coloração amarelo, solúvel em água e de fácil veiculação celular por meio de solução fisiológica (MOSSMAN, 1983 *apud* por OLIVEIRA, 2011). O MTT se acumula nas mitocôndrias de células viáveis, reduzindo o anel tetrazólico em cristais

de formazan, que tem coloração roxa, podendo a redução do MTT ser um índice de dano celular (OLIVEIRA, 2011; HAKIM et al., 2014).

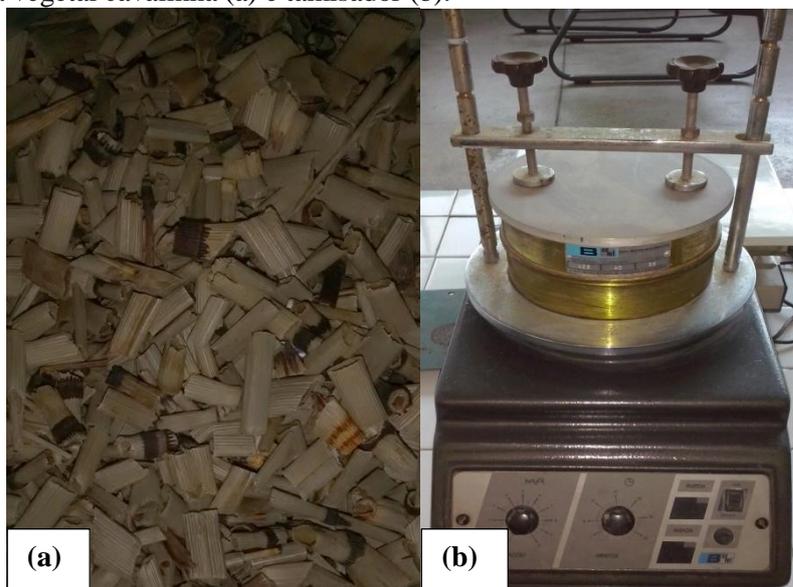
4 METODOLOGIA

As análises foram realizadas nos laboratórios de: Microbiologia e Bioprocessos localizados na área de Química do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) – Campus Maceió; e Análises Farmacêuticas e Alimentícias (LAFA) da Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR) e Farmacologia e Imunidade (LAFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), situados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Campus A.C. Simões.

4.1 Preparação da Droga Vegetal *Equisetum arvense*

A droga vegetal cavalinha (Figura 7(a)), adquirida em um ponto comercial de referência em ervanarias, localizado no centro de Maceió – Alagoas, foi pesada em balança semi-analítica (Knwaagen KN320/3) e fragmentada com o auxílio de liquidificador e uso posterior de um tamisador (Bertel, tipo magnético, modelo N.1495) (Figura 7(b)), com tamis de 35 mesh e abertura de 425 μm (40 ASTM). O material tamisado foi pesado, colocando 35 g da amostra em um primeiro frasco de vidro de 500 mL e outras 35 g em um segundo frasco de vidro de 500 mL.

Figura 7 - Droga vegetal cavalinha (a) e tamisador (b).



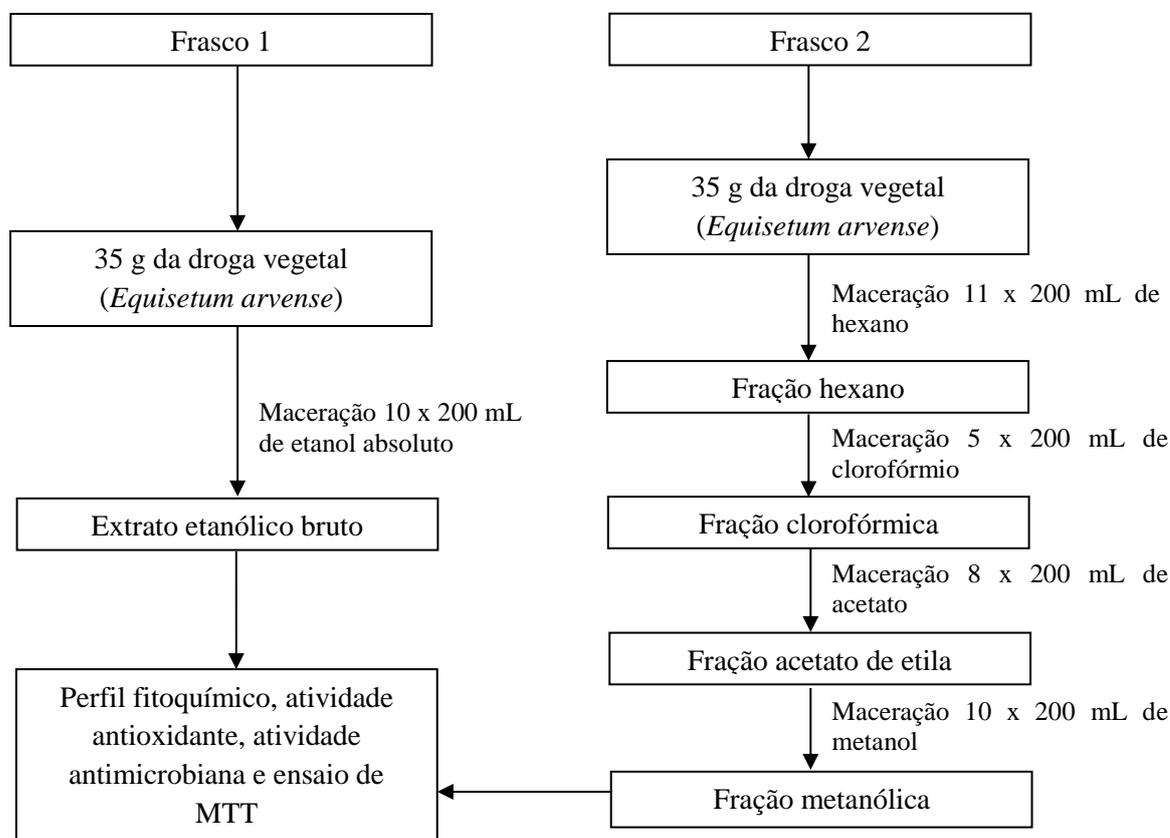
Fonte: Autora, 2017.

4.2 Preparação do Extrato Bruto e Frações da *Equisetum arvense*

Após o material vegetal ser tamisado, pesado e disposto em frascos, foram adicionados os solventes extratores, de modo a se realizar extração por maceração variada, sendo esta uma técnica de remaceração que permite a renovação do solvente extrator após a filtração do extrato e das frações, permitindo, assim, a extração quase totalitária, em suas frações, de compostos distintos a partir de solventes com diferentes gradientes de polaridade.

No frasco 1, foi realizada a extração com a utilização de etanol absoluto (10 x 200 mL). Para o frasco 2, a maceração se deu por gradiente de polaridade usando os seguintes solventes: hexano P.A. (11 x 200 mL), clorofórmio P.A. (5 x 200 mL), acetato de etila P.A. (8 x 200 mL) e metanol P.A. (10 x 200 mL). Cada solvente extrator foi adicionado até o esgotamento total do macerado e depois recuperado com o auxílio do evaporador rotativo. O extrato bruto e as frações da cavalinha, respectivamente extraídos e concentrados, foram reservados para posterior análise fitoquímica, de bioatividade antimicrobiana e de citotoxicidade (Figura 8).

Figura 8 - Esquema da maceração da *Equisetum arvense* para obtenção do extrato bruto e das frações.



Fonte: Autora, 2017.

Para calcular o rendimento obtido do extrato e de cada fração usa-se a equação I:

$$(I) \quad R\% = \frac{m_{\text{extrato/fração}}}{m_{\text{droga}}} \times 100$$

Onde,

- $R\%$ = rendimento;
- $m_{\text{extrato/fração}}$ = massa do extrato ou da fração;
- m_{droga} = massa da droga vegetal.

4.3 Perfil Fitoquímico

4.3.1 Diluição do extrato e frações

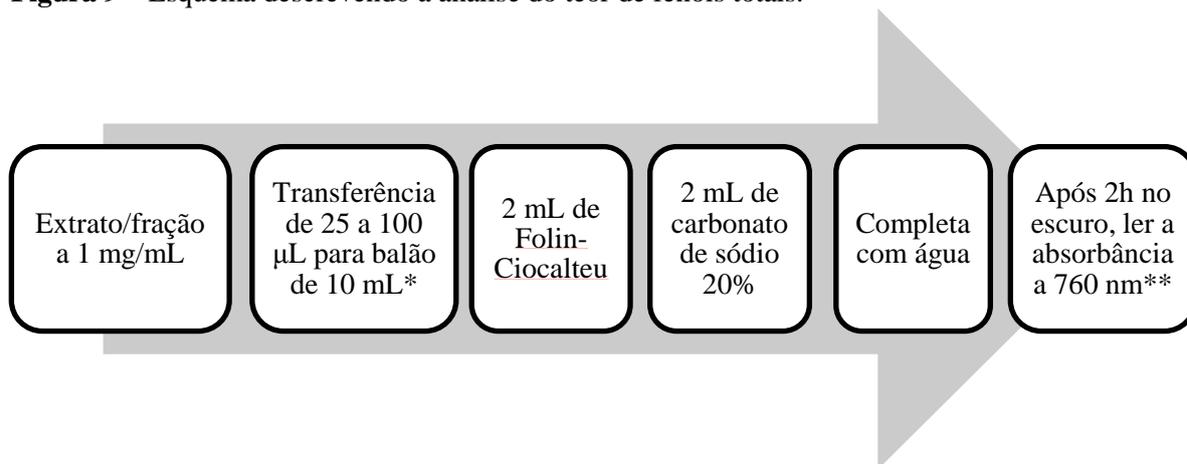
Em seus respectivos eppendorfs, foram pesados 3 mg do extrato e de cada fração e diluídos em 0,3 mL metanol grau HPLC para obter uma concentração de 10 mg/mL. Estes eppendorfs passaram pelo ultrassom (Unique modelo USC700), seguidos de uma centrifugação, até que as amostras solubilizassem e seus sedimentos precipitassem. Após, 100 μL da parte sobrenadante do extrato e de cada fração foi transferida para outros eppendorfs e acrescidos 900 μL de metanol grau HPLC, obtendo amostras com concentração de 1 mg/mL (ou 1000 $\mu\text{g/mL}$). Sendo esta diluição realizada sempre que preciso para os testes fitoquímicos e atividade antioxidante.

4.3.2 Teor de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados seguindo a metodologia descrita por De Mendonça et al. (2015) com adaptações. A partir do extrato e frações na concentração inicial de 1 mg/mL, foram transferidos de 25 a 100 μL destes para balões volumétricos de 10 mL, acrescidos de 2 mL da solução de Folin-Ciocalteu mais 2 mL da solução de carbonato de sódio 20% e completa-se com água destilada até o menisco, obtendo diferentes concentrações finais do extrato e frações, sendo 3,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ para extrato etanólico; 2,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para a fração hexano; 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para a clorofórmica; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para a fração acetato de etila, e 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para metanólica. Como branco foi utilizada uma solução de Folin-Ciocalteu mais carbonato de sódio 20% ajustados para 10 mL com água e como padrão, o ácido gálico. Os balões foram acondicionados no escuro durante 2 horas, em seguida as soluções foram transferidas para cubetas e a absorbância foi verificada no

espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1280) a um comprimento de onda de 760 nm (Figura 9). A mudança de coloração de azul para amarelo indicou a presença de fenóis, sendo que quanto mais amarelo, mais fenóis presentes na amostra. O teor de fenóis totais foi exposto em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato ou fração (mg EAG/g do extrato ou fração).

Figura 9 – Esquema descrevendo a análise do teor de fenóis totais.

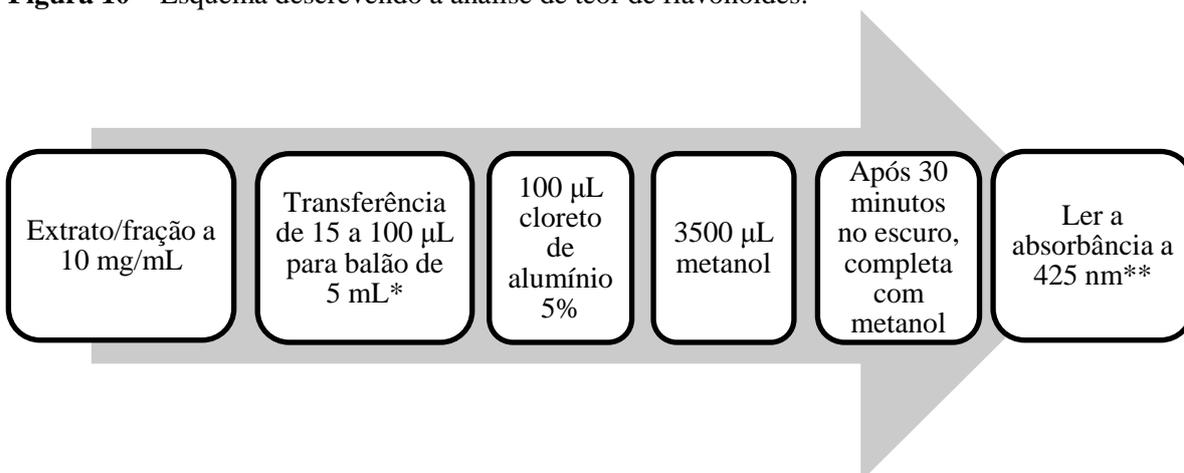


Fonte: Autora, 2017. *Concentrações finais: 3,0 e 5,0 µg/mL para extrato bruto etanólico; 2,5 e 10,0 µg/mL para a fração hexano; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL para a clorofórmica; 2,0; 5,0 e 10,0 µg/mL para a de acetato de etila, e 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL para metanólica. **O resultado foi exposto em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato ou fração (mg EAG/g do extrato ou fração).

4.3.3 Determinação de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais foi quantificado de acordo com LUGO (2015), com algumas adaptações. O extrato bruto e as frações utilizados inicialmente se encontravam na concentração de 10 mg/mL, sendo transferidos de 15 a 100 µL destes para balões volumétricos de 5 mL, acrescentando 100 µL de cloreto de alumínio 5% e 3500 µL de metanol. As soluções foram acondicionadas por 30 minutos no escuro e, logo após, foram completadas com metanol até o menisco para obtenção de diferentes concentrações finais do extrato e frações, sendo de 30 e 40 µg/mL para o extrato etanólico e fração metanólica; 30, 40 e 100 µg/mL para a fração acetato de etila; e, 60 e 200 µg/mL para as de hexano e clorofórmio, em seguida as soluções foram transferidas para cubetas. Uma solução de cloreto de alumínio à 5% em metanol foi utilizada como branco. A substância padrão usada foi a quercetina e os resultados foram expressos em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato ou fração (mg EQ/g do extrato ou fração). A leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1280) a 425 nm (Figura 10).

Figura 10 – Esquema descrevendo a análise de teor de flavonóides.



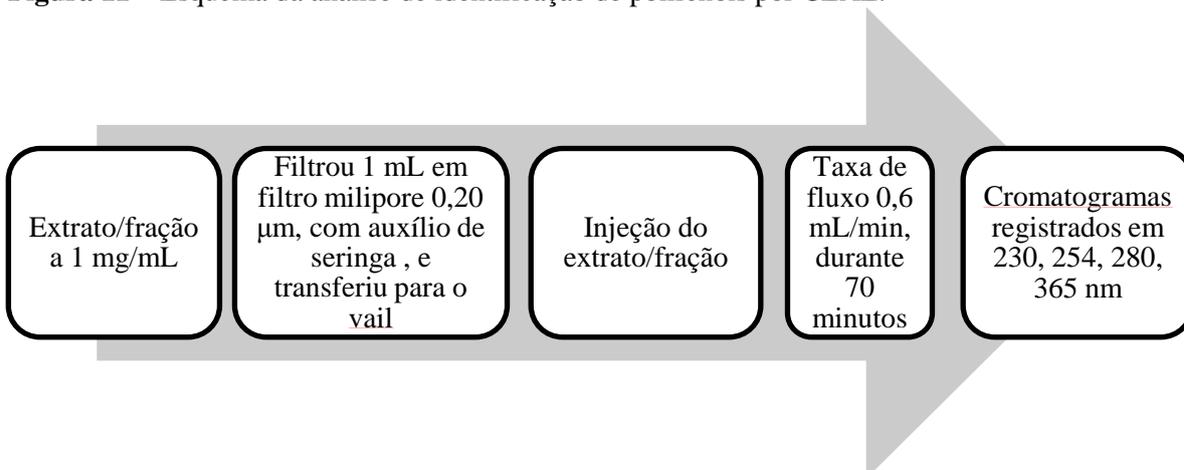
Fonte: Autora, 2017. *Concentrações finais: 30 e 40 µg/mL para o extrato bruto etanólico e fração metanólica; 30, 40 e 100 µg/mL para a fração de acetato de etila; e, 60 e 200 µg/mL para a de hexano e clorofórmio. **O resultado foi exposto em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato ou fração (mg EQ/g do extrato ou fração).

4.3.4 Identificação de compostos polifenólicos através de CLAE

Para tal teste, foi transferido 1 mL de cada extrato bruto e fração a 1 mg/mL para seus respectivos vials, filtrando-os em filtro milipore 0,20 µm com o auxílio de uma seringa.

O perfil cromatográfico foi realizado em HPLC com detector de ultravioleta (UV) e arranjo de diodo (DAD) (bomba de alta pressão LC-20ADXR, desgaseificador DGU-20A3R, auto injetor modelo SIL-20AXR, forno para coluna cromatográfica modelo KINETEX XB C18 (150 x 4,60 mm; 5 µm/100° A), detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, controladora CBM-20A, detector de fluorescência modelo RF-20A e software Labsolution da Shimadzu), onde o extrato e frações foram injetados, numa taxa de fluxo de 0,6 mL/min e por 70 minutos, utilizando por fase estacionária uma coluna de fase reversa Jupiter 5u C18 300A, e por fase móvel uma mistura de metanol, água e ácido trifluoroacético 0,1%. As substâncias utilizadas como padrão, com alto grau de pureza, foram: ácido clorogênico (50 µg/mL), ácido ρ -coumárico (100 µg/mL), apigenina (80 µg/mL), crisina (100 µg/mL), luteolina (80 µg/mL), myricitrina (100 µg/mL), quercetina (100 µg/mL), quercitrina (80 µg/mL) e rutina (100 µg/mL). Os cromatogramas foram registrados a 230, 254, 280 a 365 nm por UV-DAD (Figura 11).

Figura 11 – Esquema da análise de identificação de polifenóis por CLAE.



Fonte: Autora, 2017.

4.4 Atividade antioxidante por DPPH

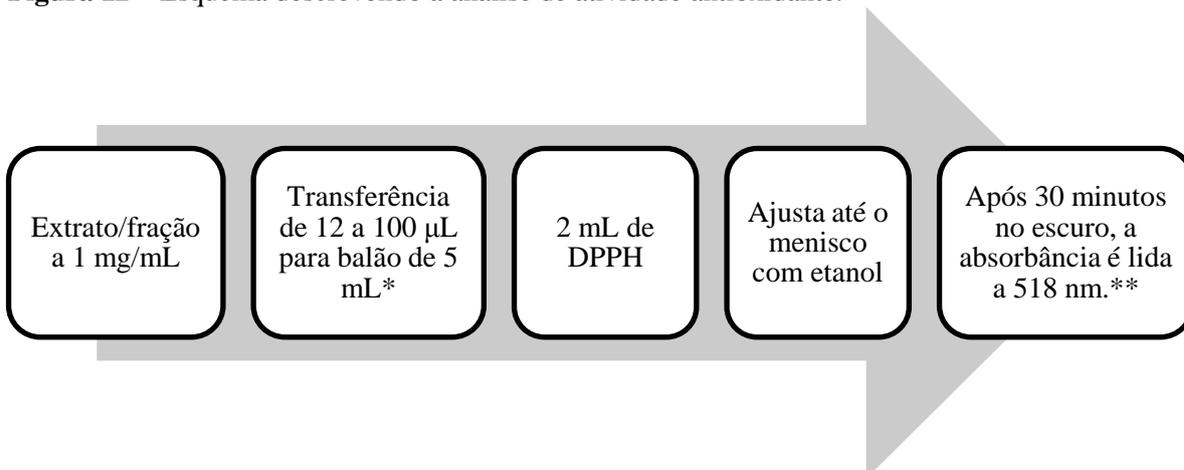
A atividade antioxidante foi determinada segundo De Mendonça et al. (2015) com adaptações. As análises foram realizadas com o extrato bruto e frações a uma concentração inicial de 1000 µg/mL, a partir de onde foram transferidos de 12 a 100 µL destes para balões volumétricos de 5 mL, acrescidos de 2 mL da solução etanólica de DPPH e ajustados até o menisco com etanol, obtendo diferentes concentrações finais da amostra (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20 µg/mL). Após a adição dos reagentes, os balões foram acondicionados por 30 minutos no escuro. O etanol foi utilizado como branco. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1280) a 518 nm (Figura 12). Como padrão foi utilizado o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) nas mesmas concentrações do extrato e frações. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%Antioxidante), sendo calculada pela equação (II):

$$(II) \quad \% \text{Antioxidante} = \frac{100 - ((\text{ABS}_{\text{amostra}} - \text{ABS}_{\text{branco}}) \times 100)}{\text{ABS}_{\text{controle}}}$$

Onde:

- $\text{ABS}_{\text{amostra}}$ = absorvância da solução do extrato bruto e frações em DPPH;
- $\text{ABS}_{\text{controle}}$ = absorvância da solução referência em DPPH;
- $\text{ABS}_{\text{branco}}$ = absorvância da solução do extrato e frações sem DPPH.

Figura 12 – Esquema descrevendo a análise de atividade antioxidante.



Fonte: Autora, 2017. *Concentrações finais: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20 µg/mL. **O resultado foi exposto em percentagem.

4.5 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

4.5.1 Diluição do extrato bruto e frações

O extrato bruto etanólico e as frações foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL e 62,5 mg/mL.

4.5.2 Preparação do inóculo

Primeiramente, realizou-se a higienização dos frascos e utensílios. Após estes foram esterilizados em autoclave por um tempo de 20 minutos, a uma pressão de 1 KgF/cm² a temperatura de 121 °C. Os meios de cultura, após ser preparados, também foram esterilizados em autoclave (Autoclave de Mesa Digitale modelo 1.2).

4.5.2.1 Meio caldo triptona de soja (TSB)

Meio altamente nutritivo recomendado para o cultivo de diversos microrganismos, usado para ativar as bactérias e também para inoculação das mesmas, funcionando, assim, como meio de crescimento.

Preparado com digestão pancreática de caseína (17 g), digestão papáica de farinha de soja (3 g), cloreto de sódio (5 g), fosfato potássico dibásico (2,5 g) e dextrose (2,5 g) para 1000 mL de água, com pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C e posterior esterilização em autoclave.

4.5.2.2 Meio ágar Mueller-Hinton

Meio de cultura recomendado pela ANVISA para testes de difusão em disco. Utilizado para inocular as bactérias de modo a verificar, por meio de seus halos, se as mesmas são sensíveis aos antibióticos de referência (antibiótico padrão com uso já comprovado na literatura e perante órgãos de saúde para o tratamento de tal microrganismo) e ao extrato e frações de *Equisetum arvense*.

Preparado com peptona de caseína (17,5 g), peptona de carne (2,0 g), amido (1,5 g), ágar (17,0 g) para 1000 mL de água, com pH $7,3 \pm 0,2$ e posteriormente esterilizado em autoclave.

4.5.2.3 Ativação das cepas das bactérias

As cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, comercializadas pelo Laborclin, sendo todas ATCC (Tabela 1), foram ativadas com a utilização de 3 mL do meio TSB e com o auxílio de uma estufa a 35-37 °C, onde permaneceu por 4h, conforme descrição do fabricante.

Tabela 1 - Etiquetas das embalagens das cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando a cepa, o lote e a validade.

Microrganismo	Cepa	Lote	Validade
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	60728045	14/07/2019
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	60711012	26/06/2019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	60712036	04/07/2019

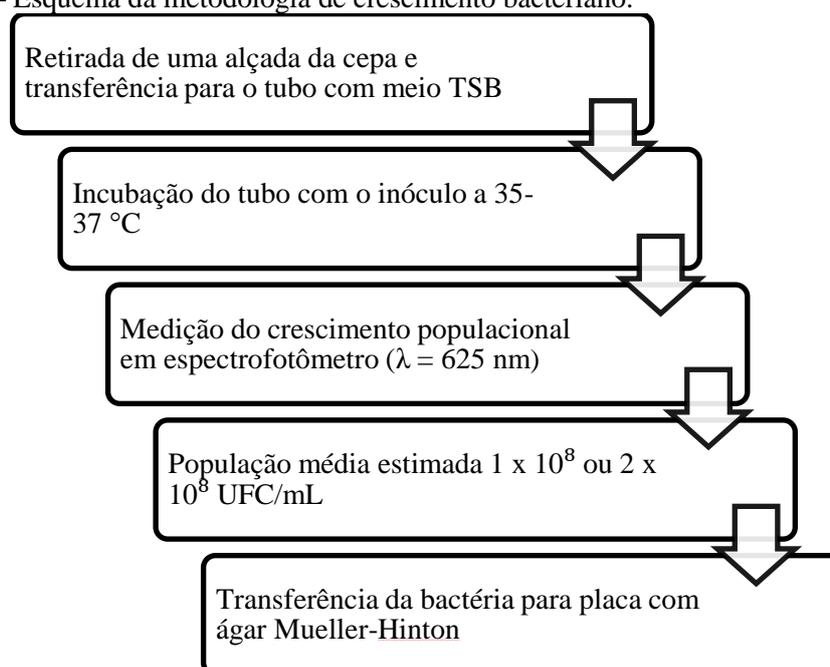
Fonte: Autora, 2017.

4.5.2.4 Método do crescimento

Realizado de acordo com NCCLS (2003).

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada ou flambada, é retirada uma alçada do frasco da cepa de *E. coli* e transferida para tubos de ensaio que contém meio TSB. Os tubos de TSB já inoculados foram incubados a 35-37 °C em estufa microbiológica (Fanem, modelo 002 Cb) até atingir a turbidez de uma solução de McFarland 0,5, podendo ser vista a olho nu ou por meio da absorbância através do uso de espectrofotômetro (modelo Nova 2000) no comprimento de onda de 625 nm, ou seja, até atingir uma população média bacteriana estimada de 1×10^8 ou 2×10^8 UFC/mL (Figura 13). Esta mesma operação foi realizada para o crescimento de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* a partir de suas respectivas cepas.

Figura 13 – Esquema da metodologia de crescimento bacteriano.



Fonte: Autora, 2017.

4.5.2.4.1 Solução de McFarland 0,5

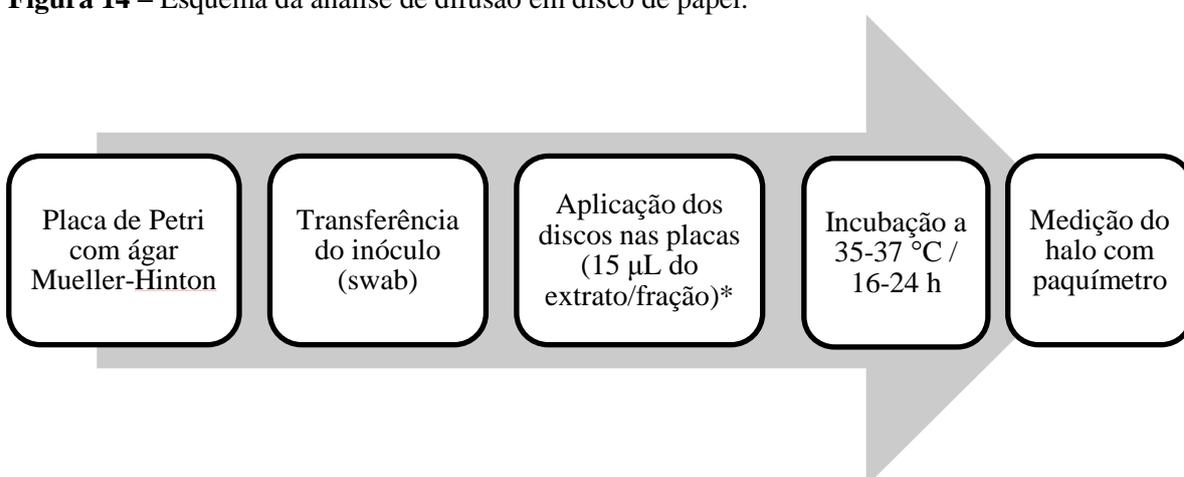
É usada como controle de turbidez para o inóculo, padronizando a densidade deste para realização do teste de sensibilidade. A solução padrão de McFarland 0,5 de sulfato de bário (BaSO_4) é preparada adicionando 0,5 mL de BaSO_4 0,048 mol/L a 99,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,18 mol/L. Esta suspensão deve ser homogeneizada constantemente e o controle de turbidez realizado através da determinação da absorbância com o auxílio de espectrofotômetro, que deve variar de 0,08 a 0,10 em um comprimento de onda de 625 nm. Esta suspensão deve ser colocada em um tubo de ensaio com tampa, numa alíquota de 4 a 6 mL, protegida da luz e em temperatura ambiente, devendo ser agitada constantemente a cada uso.

4.5.3 Método por difusão em disco de papel

Após o crescimento das bactérias em meio TSB, estas foram transferidas para as suas respectivas placas de Petri, contendo meio ágar Mueller-Hinton, para que o extrato bruto e cada fração fossem testados, conforme descrito NCCLS (2003) e usando os antibióticos de primeira escolha também relatados por CLSI (2014). Com o auxílio de um swab estéril, o inóculo foi transferido para as placas, de forma que o swab foi esfregado por toda a superfície destas, garantindo a distribuição uniforme do microrganismo. Esperou-se por alguns minutos até que o inóculo fosse absorvido e em seguida os discos foram aplicados na placa, em um total de seis discos por placa. Um disco do antibiótico padrão, escolhido a depender da

bactéria utilizada, sendo oxacilina 1µg, ampicilina 10 µg e ceftazidima 30 µg usados para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente, funcionando como controle positivo; um disco de DMSO 1%, funcionando como controle negativo; e, os quatro outros discos da placa foram do extrato e frações obtidos da *Equisetum arvense* em diferentes concentrações, sendo transferidos 15 µL do extrato e das frações para cada disco de papel estéril medindo 6 mm. As placas foram, então, incubadas a 35-37 °C por 16-24 h e após seus halos de inibição medidos com uso de paquímetro (Figura 14). Toda esta operação foi realizada em bancada de inox devidamente higienizada com álcool iodato e fazendo uso de bico de bunsen.

Figura 14 – Esquema da análise de difusão em disco de papel.



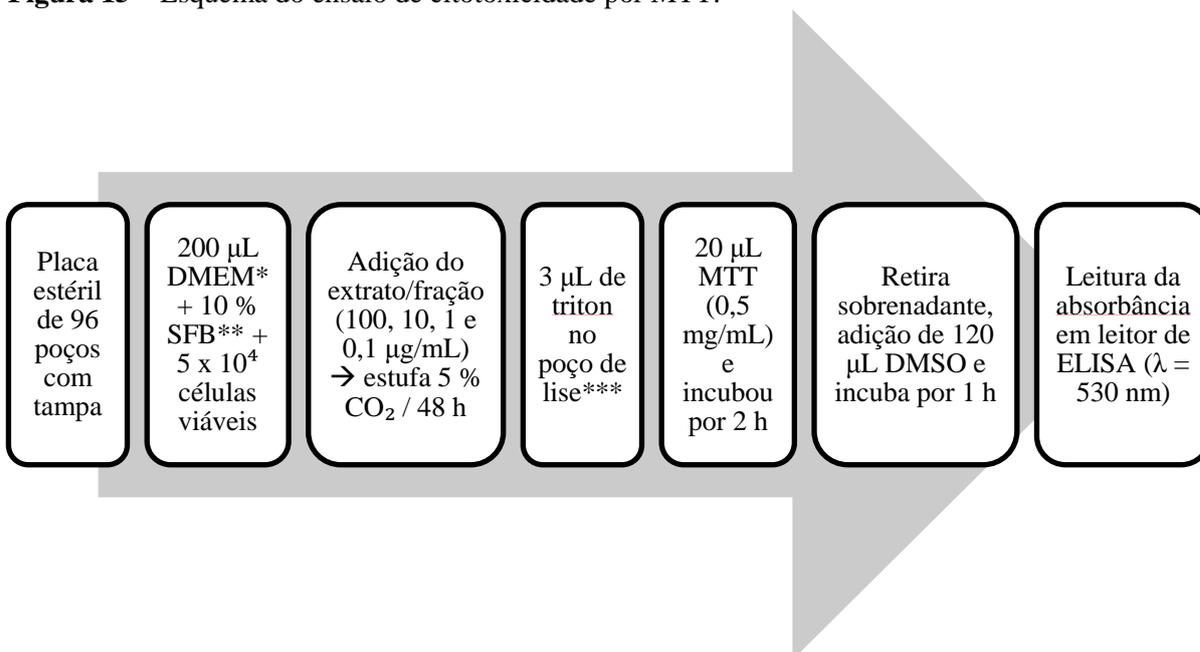
Fonte: Autora, 2017. *Antibiótico padrão (*S. aureus* = oxacilina 1µg, *E. coli* = ampicilina 10 µg e *P. aeruginosa* = ceftazidima 30 µg), padrão negativo (disco de DMSO 1%), e discos do extrato bruto e frações em diferentes concentrações (I - 500, II - 250, III - 125 e IV - 62,5 mg/mL).

4.6 Ensaio Citotóxico por MTT

Realizado como descrito em Silva et al. (2016), foi utilizado cultivo de células de macrófagos de linhagem J774, esta adquirida no LAFI - UFAL, laboratório onde esse teste foi realizado. Em cada poço de uma placa de 96 poços estéril e com tampa, foram adicionados 200 µL do meio (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM) nutrido com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 5×10^4 de células viáveis. O extrato bruto e as frações da cavalinha, em concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL, foram adicionados a estes poços com a intenção de tratar as células e a placa foi levada à estufa a 5% de dióxido de carbono (CO₂), onde ficou incubada por 48 h. Faltando uma hora para se completar o tempo, adicionou-se para lisar as células, no poço de lise, 3 µL de Triton para se comparar a morte celular, reincubou a placa até se completar o determinado tempo. Após, foi adicionado 20 µL de MTT (0,5 mg/mL) em cada um dos poços, cobriu a placa com papel

alumínio para que a placa ficasse acondicionada no escuro, e reincubou a mesma por mais 2 h. Depois de passado mais esse período de reincubação, o sobrenadante foi retirado e em cada poço foi adicionado 120 μL de DMSO, a placa voltou para estufa, onde ficou incubada por mais 1 h, envolvida no papel alumínio. Após todo esse processo, a leitura da absorbância foi realizada com o auxílio de um leitor ELISA (Thermo Plate, modelo TP-READER) a 530 nm de comprimento de onda (Figura 15).

Figura 15 – Esquema do ensaio de citotoxicidade por MTT.



Fonte: Autora, 2017. **Dulbecco's Modified Eagle Medium*. **Soro fetal bovino. ***Faltando 1 h para completar as 48 h, depois reincuba até completar o tempo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos do extrato bruto e das frações

Todo o procedimento para obtenção do extrato e das frações foi realizado em triplicata, obtendo assim três massas para cada, de onde foi calculada a média estimada dessas e o seu desvio padrão, após evaporação dos solventes, assim como o rendimento obtido. Na Tabela 2 estão dispostas as massas, assim como seus respectivos rendimentos.

Tabela 2 - Massa (g) e rendimento (%) do extrato e frações.

Extrato/Frações	Massa (g) \pm DP*	Rendimento (%)
Etanol	3,04 \pm 0,37	8,68
Hexano	1,01 \pm 0,23	2,88
Clorofórmio	0,56 \pm 0,23	1,60
Acetato de etila	0,38 \pm 0,23	1,08
Metanol	3,45 \pm 0,54	9,85

Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão.

Com bases nesses resultados, pode-se dizer que a fração metanólica e o extrato etanólico obtiveram melhor rendimento, respectivamente, fato este que deve ter acontecido devido tais solventes serem capazes de realizar uma extração de heterosídeos em geral. O solvente hexano, por sua vez, por ser apolar, realiza a extração de substâncias como lipídios, ceras, pigmentos e furanocumarinas. Enquanto que o solvente clorofórmio extrai bases livres de alcalóides, antraquinonas, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos, e o solvente acetato de etila, flavonóides e cumarinas simples. Sendo assim, a extração depende da polaridade do solvente extrator, que em contato com a amostra extrai as substâncias ativas principais para o estudo do extrato e de cada fração.

5.2 Teor de fenóis totais

A cavalinha é responsável por várias atividades farmacológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e vasodilatadora, estando relacionadas aos compostos fenólicos. Sendo, assim, o teor de fenóis totais da *E. arvensis* foi determinado quantitativamente em diferentes concentrações do extrato e das frações de cavalinha, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Teor de fenóis totais em diferentes concentrações do extrato e frações.

Extrato/Fração	mg EAG/g de extrato ou fração ± DP*
Etanol	
3,0 µg/mL	1,69 ± 0,002
5,0 µg/mL	1,77 ± 0,001
Hexano	
2,5 µg/mL	1,80 ± 0,002
10,0 µg/mL	1,81 ± 0,006
Clorofórmio	
2,5 µg/mL	0,97 ± 0,001
10,0 µg/mL	1,99 ± 0,001
Acetato de etila	
2,0 µg/mL	1,28 ± 0,003
5,0 µg/mL	2,17 ± 0,001
10,0 µg/mL	2,60 ± 0,003
Metanol	
5,0 µg/mL	0,96 ± 0,004
10,0 µg/mL	2,39 ± 0,003

Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão.

Como pode-se observar na Tabela 3, no decorrer que a concentração do extrato ou da fração de cavalinha aumentou, o teor de fenóis totais extraído foi maior. Entretanto, apesar de o extrato quanto as frações apresentarem substâncias fenólicas, as mesmas estiveram mais presente na fração acetato de etila da *E. arvensis*, e isso deve ter ocorrido pelo fato dessas substâncias terem maior afinidade com o solvente utilizado, já que segundo Tiwari et al. (2011) as substâncias fenólicas tem maior afinidade por solventes polares, como etanol, acetato de etila e metanol, justificando também, dessa forma, o bom teor de fenóis no extrato etanol e na fração metanol da planta.

Comparando os resultados das frações acetato de etila e clorofórmio da cavalinha obtidos com os encontrados por Čanadanović-Brunet et al. (2009) para a concentração de 10 µg/mL, observou-se que o teor de fenóis totais também foi mais elevado para a fração acetato do que para a de clorofórmio, visto que revelou resultados de $26,4 \pm 1,32$ e $1,73 \pm 0,08$ mg EAG/g, respectivamente. Porém, o método da obtenção das partições acetato de etila e clorofórmio foi através de um tratamento da fração metanol a 70%, o que pode ter causado essa diferença no teor de fenóis totais obtidos.

Já para o extrato etanólico, Kukrić et al. (2013) em sua pesquisa encontrou para uma concentração de 100 µg/mL, um teor de fenóis de $355,80 \pm 17,8$ mg EAG/g de extrato,

relatando que o conteúdo fenólico varia a depender da localização geográfica e dos fatores ambientais da região.

5.3 Determinação de flavonóides totais

Os flavonóides pertencem aos compostos fenólicos, sendo um dos grandes responsáveis pela atividade antioxidante, proporcionando a eliminação de radicais livres, atuando, por consequência, como agentes anti-inflamatórios, anticarcinogênicos e fotoprotectores (QUEIROZ et al., 2015).

Comparando os resultados obtidos, se observou que o extrato etanol e a fração acetato de etila se destacaram por possuir teor de flavonóides mais elevado do que as outras frações em estudo, e isso deve-se ao fato de serem solventes com uma afinidade maior por essa classe de metabólitos secundários. Assim como o etanol, o metanol também é capaz de extrair heterosídeos em geral, porém como o macerado da cavalinha já tinha sido esgotado com o solvente acetato de etila, isso resultou um menor teor de flavonóides na fração metanólica da cavalinha quando comparado ao extrato etanol e a fração acetato de etila. A Tabela 4 mostra os resultados encontrados de teor de flavonóides para o extrato e as frações da *Equisetum arvense*.

Tabela 4 - Teor de flavonóides totais do extrato e frações de cavalinha em diferentes concentrações.

[] Extrato/Frações	mg EQ/g extrato ou fração ± DP*
Etanol	
30,0 µg/mL	6,87 ± 0,003
40,0 µg/mL	10,01 ± 0,003
Hexano	
60,0 µg/mL	1,04 ± 0,001
200,0 µg/mL	1,65 ± 0,001
Clorofórmio	
60,0 µg/mL	1,12 ± 0,001
200,0 µg/mL	4,30 ± 0,001
Acetato de etila	
30,0 µg/mL	6,76 ± 0,002
40,0 µg/mL	8,80 ± 0,001
100,0 µg/mL	19,01 ± 0,006
Metanol	
30,0 µg/mL	3,06 ± 0,003
40,0 µg/mL	4,61 ± 0,003

Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão.

Os resultados encontrados confirmam a presença de flavonóides, e ainda corroboram com os resultados obtidos para fenóis totais, afirmando assim a presença desses compostos no extrato e nas frações da cavalinha.

5.4 Atividade antioxidante por DPPH

O extrato bruto etanólico, assim como as frações, da cavalinha obtiveram uma atividade antioxidante maior que 60%. A fração acetato de etila se destacou, sendo a melhor também em se tratando de atividade antioxidante, confirmando dessa forma a maior presença de compostos fenólicos e de flavonóides na mesma, chegando a atingir aproximadamente 95% de atividade antioxidante em 15 µg/mL da fração. Na Tabela 5 estão dispostas as percentagens da atividade antioxidante do extrato bruto, de cada fração e do Trolox, substância padrão, em diferentes concentrações.

Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato e frações de cavalinha e do Trolox em diferentes concentrações.

[] extrato/frações	%Antioxidante					
	Etanol	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Metanol	Trolox
2,5 µg/mL	63,91	61,20	61,20	65,54	63,72	82,24
5,0 µg/mL	65,58	61,84	62,39	73,56	62,14	96,92
7,5 µg/mL	67,94	63,15	62,96	78,93	65,02	97,14
10 µg/mL	68,46	62,08	62,69	84,27	62,83	97,32
15 µg/mL	72,86	64,06	62,60	94,35	63,04	97,41

Fonte: Autora, 2017.

De acordo com Čanadanović-Brunet et al. (2009), a atividade antioxidante é dose dependente, ou seja, a medida que a concentração do extrato e frações aumentam, a captura de radicais livres por DPPH também se eleva. Kukrić et al. (2013) também relaciona o aumento da atividade antioxidante com a concentração do extrato, visto que a captura de radicais livres do extrato etanol de *E. arvense* aumentou de 35,6% para 91,3% em extratos de 10 e 30 µg/mL, respectivamente, sugerindo a boa capacidade que o extrato tem em sequestrar hidrogênio. Queiroz et al. (2015), por sua vez, verificou que extratos de etanol 70% e metanol de *E. hyemale* obtiveram uma atividade antioxidante maior que 30%, podendo ser usados, segundo a literatura, como antioxidantes naturais por conta de sua constituição fitoquímica.

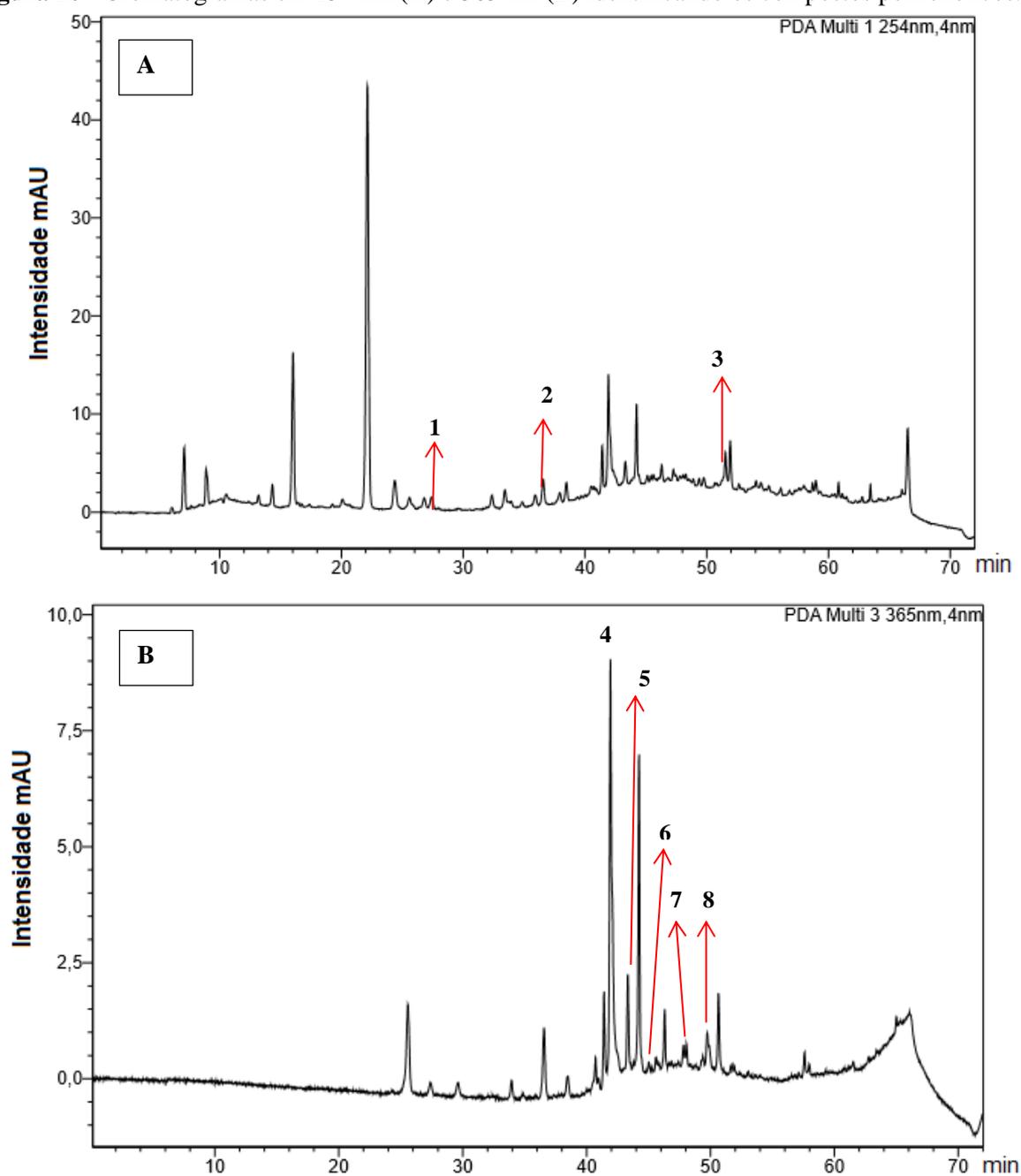
5.5 Identificação de compostos polifenólicos através de CLAE

Como observado, anteriormente, a fração acetato de etila da *E. arvense* mostrou uma boa atividade antioxidante assim como os melhores teores de fenóis e flavonóides totais, então a partir dele foi realizada a identificação de compostos polifenólicos.

Os picos cromatográficos existentes na fração, quando comparados pelo tempo de retenção, foram semelhantes aos dos oito padrões testados, corroborando a existência de compostos fenólicos, como já descrita na literatura para a cavalinha. Na Figura 16 podemos visualizar os compostos fenólicos encontrados e seus picos correspondentes. Os cromatogramas dos padrões ácido clorogênico, ácido *p*-coumárico, apigenina, myricitrina, rutina, quercitrina, quercetina, luteolina, assim como seus respectivos espectros, podem ser observados nos apêndices A, B, C, D, E, F, G e H, respectivamente, juntamente com os cromatogramas e espectros da fração, demonstrando, assim, a existência dessas substâncias na cavalinha. Čanadanović-Brunet et al. (2009) também identificou ácido *p*-coumárico e rutina na fração de acetato de etila da cavalinha, enquanto que Queiroz et al. (2015) identificou,

além da rotina, a presença de ácido clorogênico em extrato de etanol 70% e fração metanol, corroborando, dessa forma, com o presente estudo.

Figura 16 - Cromatogramas em 254 nm (A) e 365 nm (B) identificando os compostos polifenólicos.



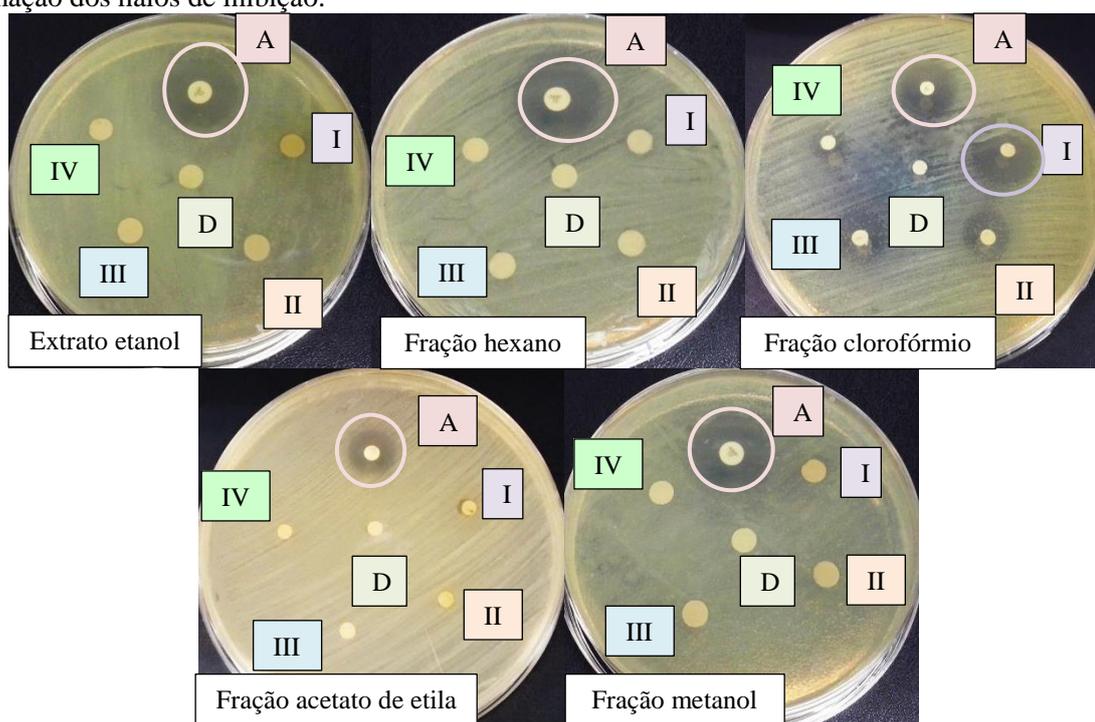
Fonte: Autora, 2017. Compostos fenólicos: 1 – ácido clorogênico, 2 – ácido ρ -coumárico, 3 – apigenina, 4 – myricitrina, 5 – rutina, 6 – quercitrina, 7 – quercetina, 8 – luteolina.

5.6 Teste de Sensibilidade por Difusão em Disco de Papel

Os ensaios antimicrobianos foram realizados com três bactérias e os resultados obtidos através da formação do halo de inibição e a medição do mesmo.

Os testes realizados com *E. coli* não proporcionaram resultados satisfatórios, como visto na Figura 17 e Tabela 6, mas isto já era esperado porque mesmo o NCCLS recomendando este teste de difusão em disco para tal microrganismo, segundo Mimica, Mendes & Mimica (2008) esse tipo de ensaio não é recomendado para bactérias anaeróbias, e por *E. coli* ser uma bactéria anaeróbia facultativa, isso pode ter afetado o desenvolvimento do teste. Porém, houve formação de halo de inibição, medindo $23,13 \pm 0,95$ mm (Tabela 6), ao redor do disco da fração clorofórmica de cavalinha na concentração de 500 mg/mL, indicando que a bactéria foi sensível a esta fração, e como o clorofórmio extraem alcalóides e óleos voláteis, essas substâncias podem ser as responsáveis pela atividade antimicrobiana da presente fração. Também houve formação de halo de inibição nos outros discos de concentrações menores de dessa mesma fração, mas apesar do aparecimento do halo ainda ficou visível a presença de bactérias.

Figura 17 - Placas de *E. coli* com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.



Fonte: Autora, 2017. (A) antimicrobiano ampicilina 10 μ g, (D) DMSO 1%, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

Tabela 6 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a *E. coli*.

Extrato/Fração	Tamanho do Halo (mm) ± DP*				
	A	I	II	III	IV
Etanol	20,48 ± 2,08	-	-	-	-
Hexano	21,08 ± 0,98	-	-	-	-
Clorofórmio	23,90 ± 1,15	23,13 ± 0,95	-	-	-
Acetato	20,67 ± 0,32	-	-	-	-
Metanol	19,19 ± 1,25	-	-	-	-

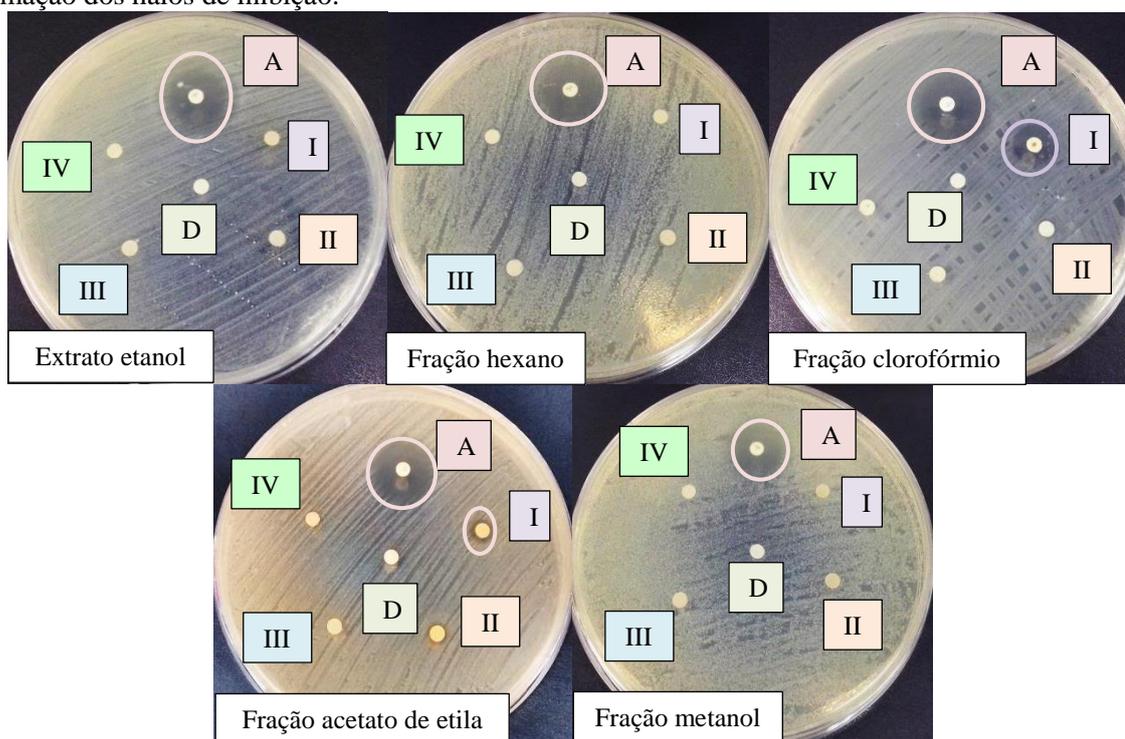
Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão. (A) antimicrobiano ampicilina 10 µg, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

Com base nos resultados, o tamanho do halo do antimicrobiano ficou dentro do já relatado na literatura, que é igual ou maior que 17 mm para *E. coli* cepa ATCC 25922 (CLSI, 2014).

Estudos realizados por Sinha (2012) encontrou um halo de inibição para *E. coli* de 32 mm para extrato etanólico de *E. arvense*, mostrando que a bactéria é sensível ao extrato. Já Radulović, Stojanović & Palić (2006) encontrou um de 25 mm, só que sua pesquisa foi realizada com óleo essencial de *Equisetum* sp., onde a forma de extração é diferente, pois o óleo essencial é obtido por meio de extração a quente seja por percolação com extrator de Soxhlet ou por arraste a vapor, enquanto o extrato obtido nesta pesquisa foi por maceração, que é um tipo de extração a frio. Hleba et al. (2014) também encontrou uma maior resistência frente a *E. coli* do extrato metanólico de *Equisetum arvense*. Radulović et al. (2006) explica que essa maior resistência a *E. coli* pode acontecer devido presença de certos lipopolissacarídeos na parede celular de bactérias Gram-negativas, promovendo uma impermeabilidade da célula microbiana, porém no mesmo estudo outras bactérias Gram-negativas conseguiram foram bem suscetíveis ao óleo essencial.

Em relação aos testes do extrato e frações frente a *S. aureus*, os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 18 e Tabela 7.

Figura 18 - Placas de *S. aureus* com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.



Fonte: Autora, 2017. (A) antimicrobiano oxacilina 1 µg, (D) DMSO 1%, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

Tabela 7 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a *S. aureus*.

Extrato/Fração	Tamanho do Halo (mm) ± DP*				
	A	I	II	III	IV
Etanol	19,55 ± 1,43	-	-	-	-
Hexano	22,70 ± 1,40	-	-	-	-
Clorofórmio	22,13 ± 1,71	16,73 ± 1,03	-	-	-
Acetato	24,00 ± 0,17	8,45 ± 0,07	-	-	-
Metanol	22,43 ± 0,81	-	-	-	-

Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão. (A) antimicrobiano oxacilina 1 µg, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

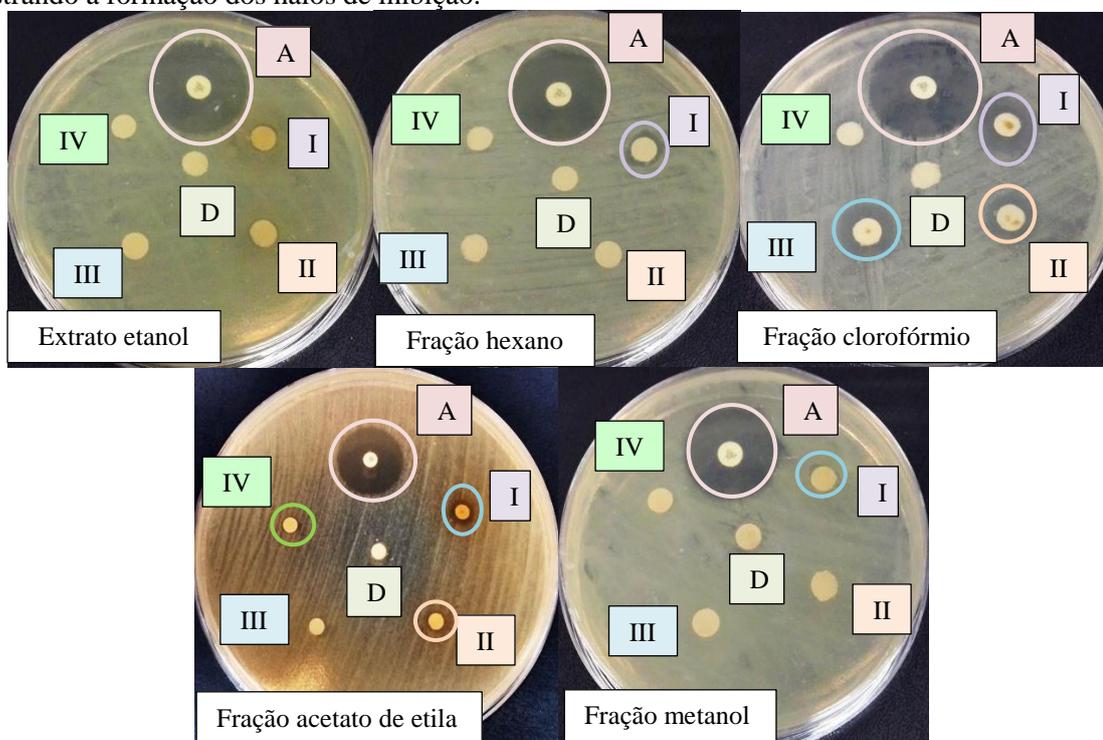
Observando os resultados obtidos, pode-se perceber que a maioria dos halos formados ao redor do antibiótico ficou dentro da faixa recomendada pelo CLSI (2014), que é igual ou maior que 22 mm, exceto na placa do extrato etanol. Também se verificou que a bactéria *S. aureus* só foi sensível as frações clorofórmio e acetato na concentração de 500 mg/mL. Dados esses que não corroboram com estudos já realizados e que obtiveram resultados positivos para a sensibilidade do extrato etanol frente este microrganismo, pois em 2014, observou que *S. aureus* foi sensível a extrato etanol e frações hexano e clorofórmio de cavalinha na concentração de 500 mg/mL, porém os meios de cultura utilizados foram infusão de cérebro e

coração (*Brain Heart Infusion* – BHI), caseína e caseína-levedura, o que pode ter influenciado nos resultados encontrados, já que estes meios não são os recomendados pela NCCLS para testes de difusão em disco. O óleo essencial de *E. arvensis* também demonstrou atividade contra *S. aureus*, como mostrado no estudo realizado por Radulović, Stojanović & Palić (2006), tendo atividade tanto bactericida como bacteriostática, porém como já colocado anteriormente as formas de obtenção de óleo essencial e extrato é diferente, o que pode influenciar nos constituintes que levam a atividade antimicrobiana.

Kukrić et al. (2013), em sua pesquisa com extrato etanólico de cavalinha, verificou que o mesmo tem uma forte atividade antimicrobiana frente a *E. coli* em comparação com *S. aureus* e *Bacillus cereus*, porém o teste de sensibilidade usado foi o de concentração inibitória mínima (CIM), o que não exclui o bom resultado encontrado por ele, já que este é um teste que correlaciona-se com o de difusão em disco.

Para o ensaio realizado frente *P. aeruginosa*, os resultados observados foram satisfatórios, podendo verificar que as bactérias acusaram sensibilidade a quatro frações, como se pode ver na Figura 19 e Tabela 8.

Figura 19 - Placas de *P. aeruginosa* com discos do antibiótico, do extrato bruto e das frações mostrando a formação dos halos de inibição.



Fonte: Autora, 2017. (A) antimicrobiano ceftazidima 30 µg, (D) DMSO 1%, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

Tabela 8 - Tamanho dos halos de inibição do antibiótico, extrato bruto e frações frente a *P. aeruginosa*.

Extrato/Fração	Tamanho do Halo (mm) ± DP*				
	A	I	II	III	IV
Etanol	24,83 ± 0,84	-	-	-	-
Hexano	22,35 ± 1,26	7,47 ± 1,07	-	-	-
Clorofórmio	23,37 ± 4,27	12,43 ± 1,25	10,17 ± 0,43	9,15 ± 1,48	-
Acetato	30,00 ± 0,80	12,63 ± 3,00	7,75 ± 0,35	-	6,98 ± 0,04
Metanol	25,50 ± 1,57	7,05 ± 0,14	-	-	-

Fonte: Autora, 2017. *DP = desvio padrão. (A) antimicrobiano ceftazidima 30 µg, I = 500 mg/mL, II = 250 mg/mL, III = 125 mg/mL, IV = 62,5 mg/mL.

Como pode perceber a *P. aeruginosa* foi sensível a quatro frações de cavalinha testadas, exceto ao extrato bruto etanol. Apesar da formação dos halos em torno dos discos das frações, estes ainda foram menores quando comparável ao descrito na CLSI (2014) para ceftazidima 30 µg frente a *P. aeruginosa* que é igual ou maior que 18 mm, se encontrando nesse parâmetro todos os halos do antimicrobiano.

Radulović, Stojanović & Palić (2006) também verificou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cavalinha frente a *P. aeruginosa*, obtendo um resultado positivo e um halo de 28 mm, sendo comparável ao halo de inibição relatado no CLSI do antibiótico utilizado aqui neste trabalho.

Em uma pesquisa realizada por Čanadanović-Brunet et al. (2009), observou-se que as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram sensíveis à concentração de 100 mg/mL da fração acetato de etila formando uma zona de inibição de 10,5 e 13,3 mm, respectivamente, porém para *E. coli* não houve a formação do halo, comprovando tal resultado com o teste de microdiluição encontrando uma concentração inibitória mínima de, respectivos, 50,0 e 25,0 mg/mL.

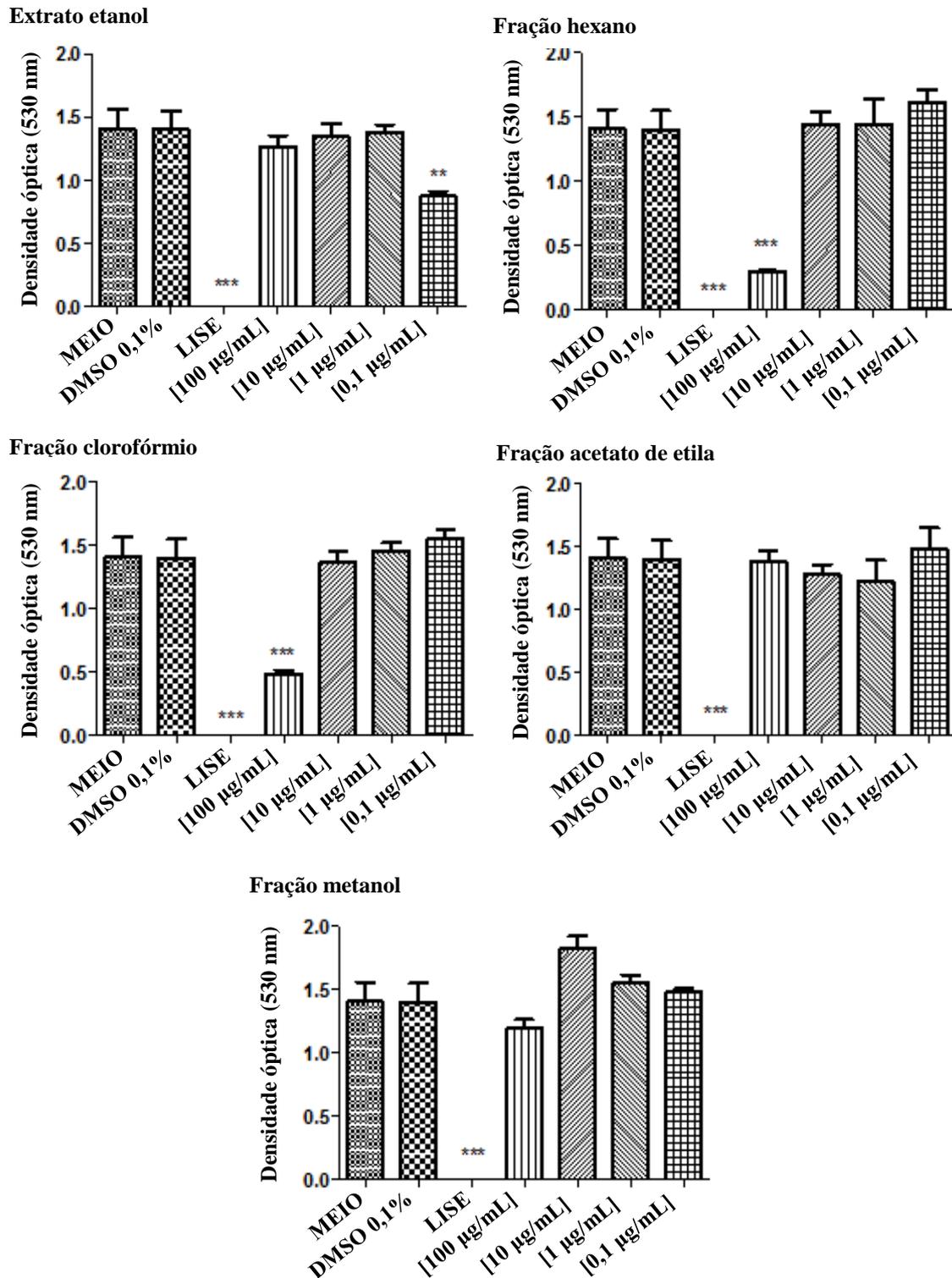
5.7 Ensaio citotóxico por MTT

Muito se tem falado em produtos fitoterápicos e plantas medicinais, mas pouco se tem pesquisado com relação a citotoxicidade de todo esse material, até porque em cada região que a espécie é plantada o solo pode mudar os constituintes da planta e torná-la tóxica.

Pouco se tem sobre a toxicidade da *Equisetum* sp., mas segundo Brasil (2016a), o extrato etanólico de *E. arvense* provoca uma toxicidade dose-dependente.

Ao realizar o teste citotóxico, pode-se observar que apenas as frações hexano e clorofórmio na concentração 100 µg/mL se apresentaram tóxicas (Figura 20), podendo essa toxicidade ter sido causada por uma maior quantidade de constituintes tóxicos presentes nessas frações quando comparado ao grupo de DMSO 1%, mostrando que o solvente utilizado para diluição dos extratos não é tóxico aos macrófagos, lembrando que solvente hexano extrai substâncias como lipídios, ceras, pigmentos e furanocumarinas, e o clorofórmio é responsável pela extração de bases livres de alcalóides, antraquinonas, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos. Em relação ao extrato etanólico, houve resultados significativos de citotoxicidade para dose de 0,1 µg/mL, não havendo para as doses mais concentradas, o que pode ter sido um erro ocasionado durante a análise. Porém, um estudo realizado por Badole & Kotwa (2015) verificou que o extrato etanólico de *E. arvense* funcionou de forma dose-dependente em testes toxicológicos não-clínicos, quando testados em ratas Wistar pelo período de 30 dias. Sugerindo, assim, que este extrato pode ser tóxico a depender da dose usada, o que não foi o caso do resultado *in vitro* realizado nesta pesquisa. As demais frações não apresentaram resultados significativos para citotoxicidade, resultando em frações de baixo teor tóxico.

Figura 20 - Teste citotóxico de MTT para o extrato bruto e frações da *Equisetum arvense*.



Fonte: Autora, 2017. Os valores foram considerados significativos quando ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Em relação a dose letal (Tabela 9) para eliminar 50% da população de macrófagos (CL_{50}), pode-se verificar que com 67,66 e 74,33 $\mu\text{g/mL}$ das frações hexano e metanol, respectivamente, conseguiu a morte de 50% dos macrófagos. O efeito citotóxico máximo

causado pelo extrato bruto de etanol e frações hexano, clorofórmio e metanol, todos na concentração de 100 µg/mL, foi de 15,78%, 78,78%, 9,85% e 65,35%, respectivamente, de morte da população de macrófagos. Já na fração acetato de etila da cavalinha até a concentração testada de 100 µg/mL, a CL₅₀ não pode ser observada, não apresentando atividade citotóxica até esta concentração, porém podendo ser em concentrações mais altas.

Tabela 9 - Dose letal para 50% da população (CL₅₀) e efeito citotóxico máximo do extrato bruto e frações da cavalinha.

Extrato/Fração	CL ₅₀ ^a (µg/mL ± E.P.M.)	Citotoxicidade Máximo (%± E.P.M.) ^b
Etanol	>100	15,78 ± 1,01
Hexano	67,66 ± 2,08	78,78 ± 1,14
Clorofórmio	>100	9,85 ± 1,81
Acetato de etila	>100	NT
Metanol	74,33 ± 5,03	65,35 ± 3,82

Fonte: Autora, 2017. ^aA = concentração letal 50% (CL₅₀), calculada pela curva concentração-resposta tóxicos. ^bMédia ± erro padrão da média máxima de citotoxicidade em triplicata de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo foram considerados significativos quando p* < 0,05, ** p < 0,01 comparado com o grupo de DMSO de 0,1; NT: substância apresenta nenhuma atividade significativa letal para a célula, até a concentração de 100 µg/mL em comparação com o grupo de DMSO.

6 CONCLUSÕES

Como as plantas são cultivadas em várias partes do mundo, o solo e o clima da região podem afetar o teor de constituintes ativos presentes nas mesmas, o que leva a uma alteração também nos constituintes da droga vegetal, podendo esta também ser alterada a depender da forma que é seca e a que temperatura.

A cavalinha é uma planta originária da Europa, mas cultivada em todo o mundo. Entre as atividades farmacológicas está a antioxidante, o que foi comprovado no presente trabalho, onde os extratos obtiveram uma atividade antioxidante maior que 60%, chegando a mais de 90% para o extrato acetato de etila, corroborando com o maior teor de fenóis e de flavonóides totais também encontrados neste, assim como a presença dos compostos fenólicos identificados por CLAE.

Em relação a atividade antimicrobiana, a *P. aeruginosa* foi sensível as frações de *E. arvense*, exceto ao extrato etanólico, enquanto que a *S. aureus* foi sensível as frações clorofórmio e acetato de etila, e a *E. coli* apenas a fração clorofórmica, não corroborando de forma totalitária com o que já foi descrito na literatura. Porém, relacionando a atividade antimicrobiana com o perfil polifenólico verificou que a fração acetato de etila se destacou, já que a atividade antimicrobiana tem relação com compostos fenólicos.

O ensaio citotóxico também revelou que a fração acetato de etila da cavalinha não apresentou atividade letal significativa para células na concentração mais alta a ser testada, colaborando com resultados obtidos.

Logo, a fração acetato de etila da *E. arvense*, de um modo geral, se destacou entre o extrato bruto e as frações pelo fato de apresentar uma boa atividade antioxidante e também funcionar como antibiótico, além de não apresentar citotoxicidade significativa. Porém, todas as frações, assim como o extrato bruto, apresentaram bioatividade, algumas com maiores percentuais para sequestrar radicais livres e outras com maior poder antimicrobiano, sendo que as frações hexano e clorofórmica apresentaram uma dose letal para célula maior que 50%, devendo, então, se atentar o quanto as plantas medicinais também pode ser tóxica aos animais e ao ser humano.

7 PERSPECTIVAS

Entre as perspectivas estão realização do perfil fitoquímico, atividade antioxidante, análise microbiológica e ensaio citotóxico numa extração por meio de infusão da cavalinha, para assim verificar se o chá também tem as mesmas características do extrato bruto etanólico e frações. Realizar também os testes com Zebrafischer, ensaios para verificação de poder cicatrizante, testes microbiológicos com outros microrganismos, como a *Candida albicans*, e a identificação de mais compostos da planta, para, então, no futuro, caso surja oportunidade, formular um fitoterápico, ou um cosmético já que a cavalinha tem alto potencial antioxidante, de *Equisetum arvense*, e assim ajudar cada vez mais a divulgar a planta tanto no meio acadêmico quanto na sociedade como um todo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 06 mar. 2009. Disponível em <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>
Acesso em: 23 jan. 2017.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

BADOLE, S.; KOTWA, S. Biochemical, hematological and histological changes in response to graded dose of extract of *Equisetum arvense* in adult female wistar rats. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, v. 6, n. 8, p. 3321-3326, 2015.

BELLAMAKONDI, P. K. et al. *In vitro* cytotoxicity of *Caralluma* species by MTT and Trypan blue dye exclusion. **Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p.17-19, 2014. ISSN-0974-2441.

BERTALOT, M. J. A. et al. Métodos alternativos para controle de doenças fúngicas na cultura de jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) através de *Equisetum* spp e preparado biodinâmico 501. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 264-27, 2010. ISSN: 1980-9735.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Memento Fitoterápico: Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed., Brasília: ANVISA, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. N 31, Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016b.

CAMATTI-SARTORI, V. et al. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 117- 122, 2011. ISSN: 1980-9735

ÂCANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. et al. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 269–278, 2009.

CARNEIRO, M. E. **Obtenção de nanossílica de *Equisetum arvense* L. e sua utilização na modificação de lâminas de madeira de *Schizolobium parayba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby.** 2012. 137 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos.** 2 ed. rev., Campinas: Editora da Unicamp, 2003. ISBN: 85-268-0641-6.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. **CLSI document M100-S24.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

COSENZA, G. P. **Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina.** 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CROFTS, T. S.; GASPARRINI, A. J.; DANTAS, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nature Reviews Microbiology**, Abr. 2017.

ĆUJIĆ, N. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135–142, 2016.

CUNHA, J. A. O. **Associação do extracto de *Equisetum arvense* ao bonelike®: atividade osteogénica e antimicrobiana.** 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Porto, Porto, Portugal, Jul. 2008.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2015. DOI 10.1186/s12906-015-0888-9.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

FERREIRA, H.; PERES LALA, E. R. *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.12, n. 2, p. 44-50, 2010.

FERREIRA, V. B. N. **Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *Equisetum arvense* e da *Marsypianthes chamaedrys***. 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FRANCO, R. M. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. 2002. 144f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

FUENTEFRIA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

GUIMARÃES, S. S. et al. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 143-149, 2015.

GUIMARÃES, S. S. **Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.)na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro***. 2012. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2012.

HAKIM, M. N. et al. Effects of *Centellaasiatica* L., *Curcuma longa* L., and *Strobilanthes crispus* L. extracts on 3 kidney cell lines: *in vitro* cytotoxicity analysis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, s. 2, p 388-392, 2014. ISSN- 0975-1491

HLEBA, L. et al. Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 4, p. 269-274, 2014. DOI:10.1016/S2222-1808(14)60571-5.

HUSBY, C. Biology and functional ecology of *Equisetum* with emphasis on the giant horsetails. **The Botanical Review**, v. 79, n. 2, p. 147–177, 2013. DOI 10.1007/s12229-012-9113-4.

KORB, A. et al. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.13, n. 1, 2013. ISSN 1519-5228.

KUKRIĆ, Z. et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 19, n. 1, p. 37–43, 2013.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F (ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, Atheneu, 2008.

LUGO, Y. O. **Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de *Diospyros hispida* A. DC.** 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

LUKAČIŠINOVÁ, M.; BOLLENBACH, T. Toward a quantitative understanding of antibiotic resistance evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, p. 90–97, 2017.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F (ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, Atheneu, 2008.

MATSUYAMA, B. Y. et al. Mechanistic insights into c-di-GMP–dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. E209–E218, 2015. Disponível em < <http://www.pnas.org/content/113/2/E209.full.pdf> > Acesso em: 10 fev. 2017.

MELLO, M.; BUDEL, J. M. *Equisetum* L. (Equisetaceae): uma revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**. Curitiba, n. 9, p. 1-15, s.d. ISSN 1984-7041.

MILOVANOVIĆ, V. et al. Antioxidant, Antimicrobial and Genotoxicity Screening of Hydro-alcoholic Extracts of Five Serbian *Equisetum* Species. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 113–119, 2007. DOI 10.1007/s11130-007-0050-z

MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, Atheneu, 2008.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico**. 2005. 293 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - 8 ed. **NCCLS document M2-A8**. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. ISBN 1-56238-485-6.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, J. R. **Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbicida mínima para *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* e *Candida spp.*** 2011. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2011.

OWINGS, J. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* EftM is a Thermoregulated Methyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3280–3290, 2016.

QUEIROZ, G. M. et al. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 7, p. 830-834, 2015.

RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; PALIĆ, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **Phytotherapy Research**, n. 20, p. 85-88, 2006.

RODRIGUES, C. et al. Avaliação preliminar fitoquímica da espécie *Equisetum arvense* (cavalinha). *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 7, 2011, Maringá. **Anais eletrônicos...** Maringá, 2011. Disponível em: <[http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/camila_rodrigues%20\(1\).pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/camila_rodrigues%20(1).pdf)> Acesso em: 12 jan. 2017.

SÁ, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012. ISSN 1808-4532.

SANDHU, N. S.; KAUR, S.; CHOPRA, D. *Equisetum arvense*: pharmacology and phytochemistry – a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 3, n. 3, p. 146-150, 2010. ISSN 0974-2441.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, Dez. 2007.

SANTOS, S. C.; DE MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SILVA, A.L.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, supl. I, p.307-315, 2016.

SINGH, B. et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. **Food Chemistry**, v. 206, p. 1-11, 2016.

SINHA, S. N. In vitro antibacterial activity of ethanolic extract of *Equisetum arvense* L. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 3, n. 1, p. 19-21, Feb.-Mar. 2012. ISSN 0976-285X.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F (ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, Atheneu, 2008.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, Jan-Mar 2011.

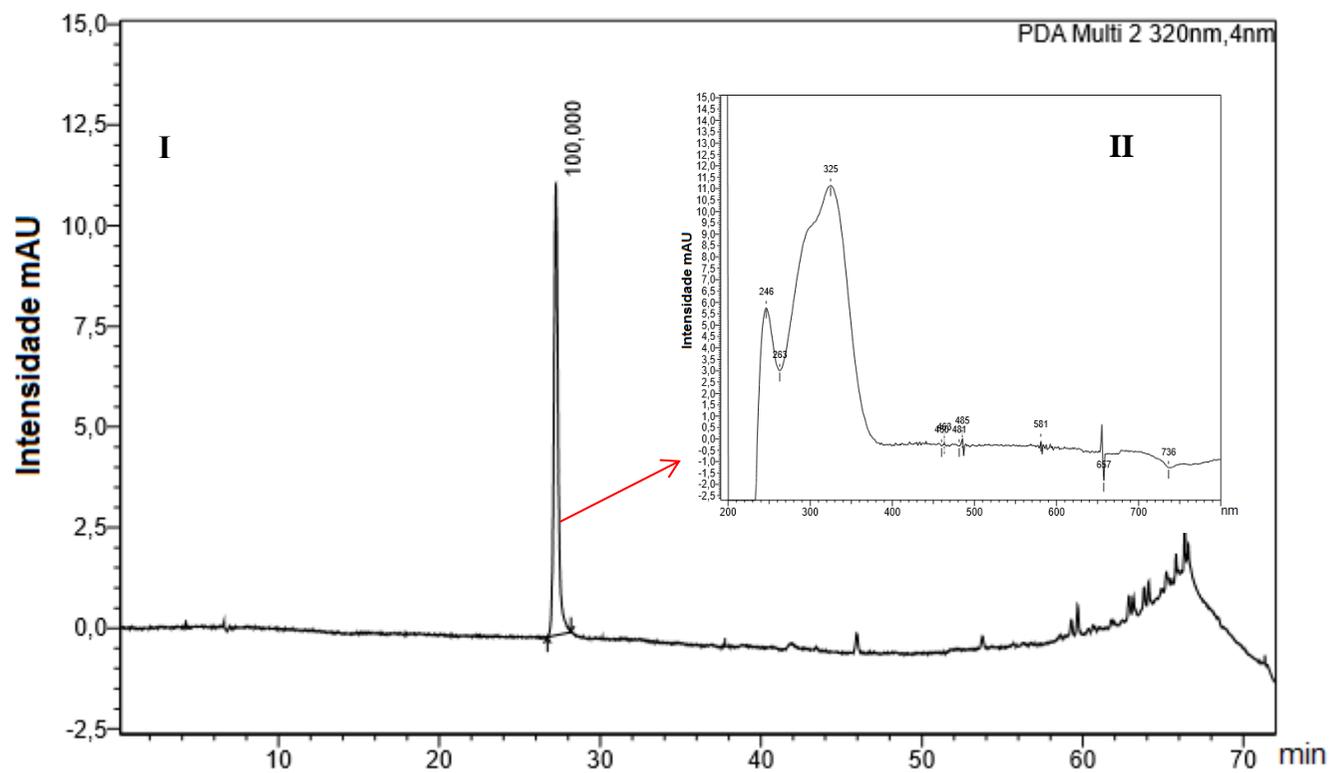
TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRIVEDI, S.; LAL, N. Antioxidant enzymes in periodontitis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 7, p. 54-57, 2017.

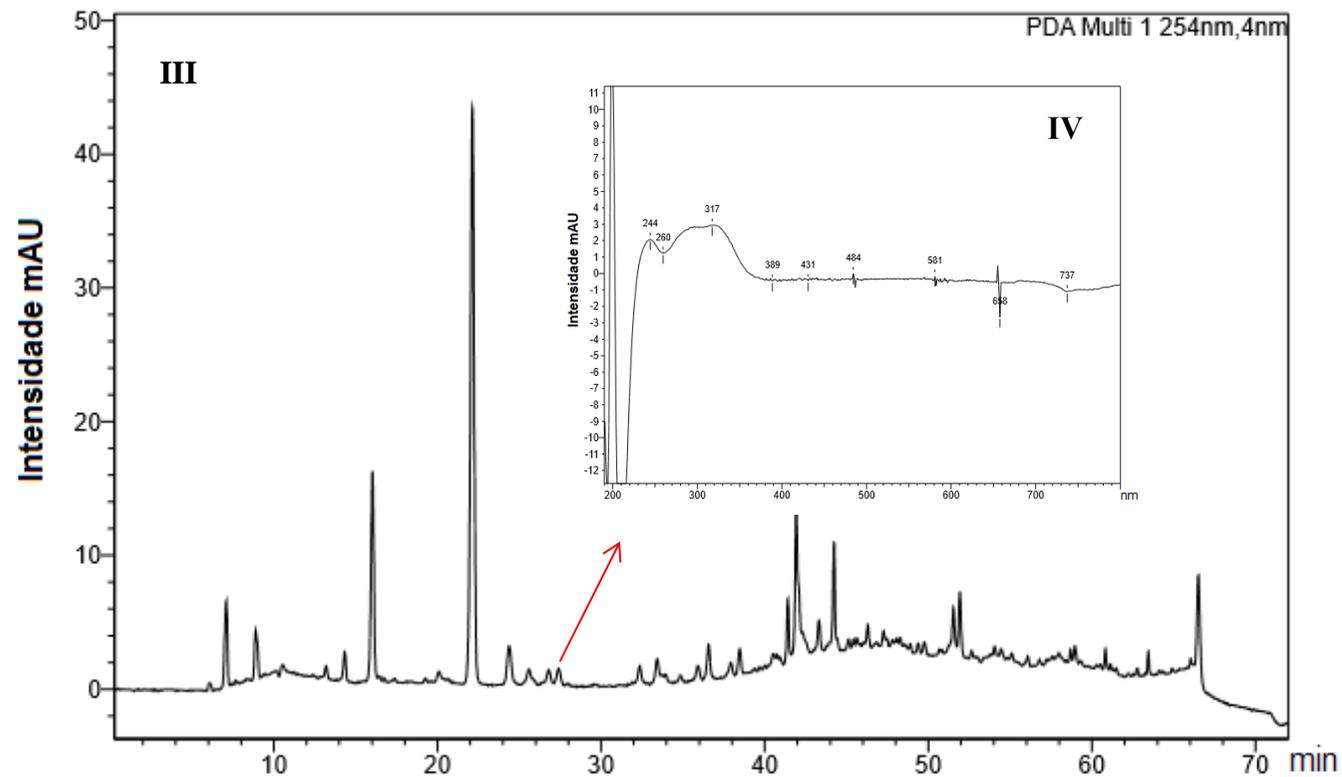
ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

APÊNDICES

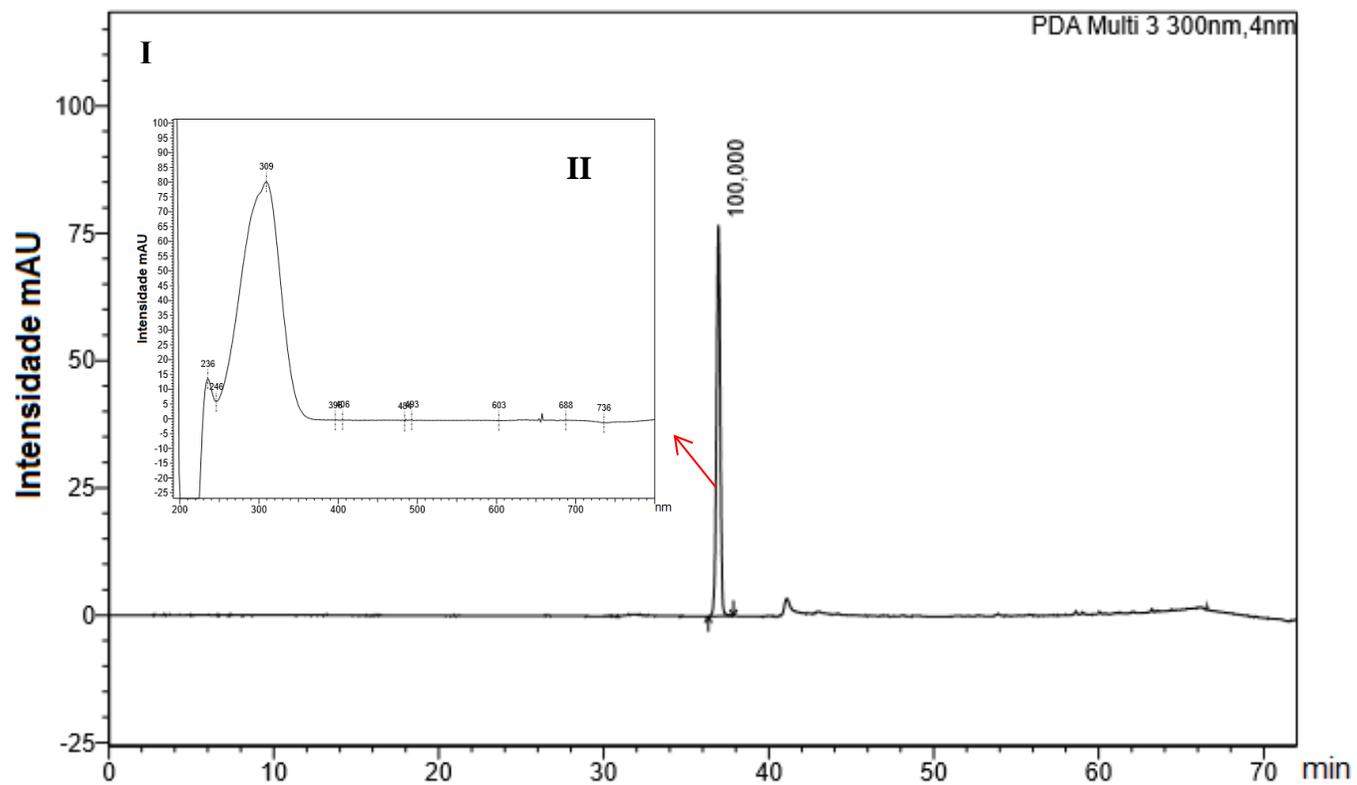
Apêndice A - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido clorogênico

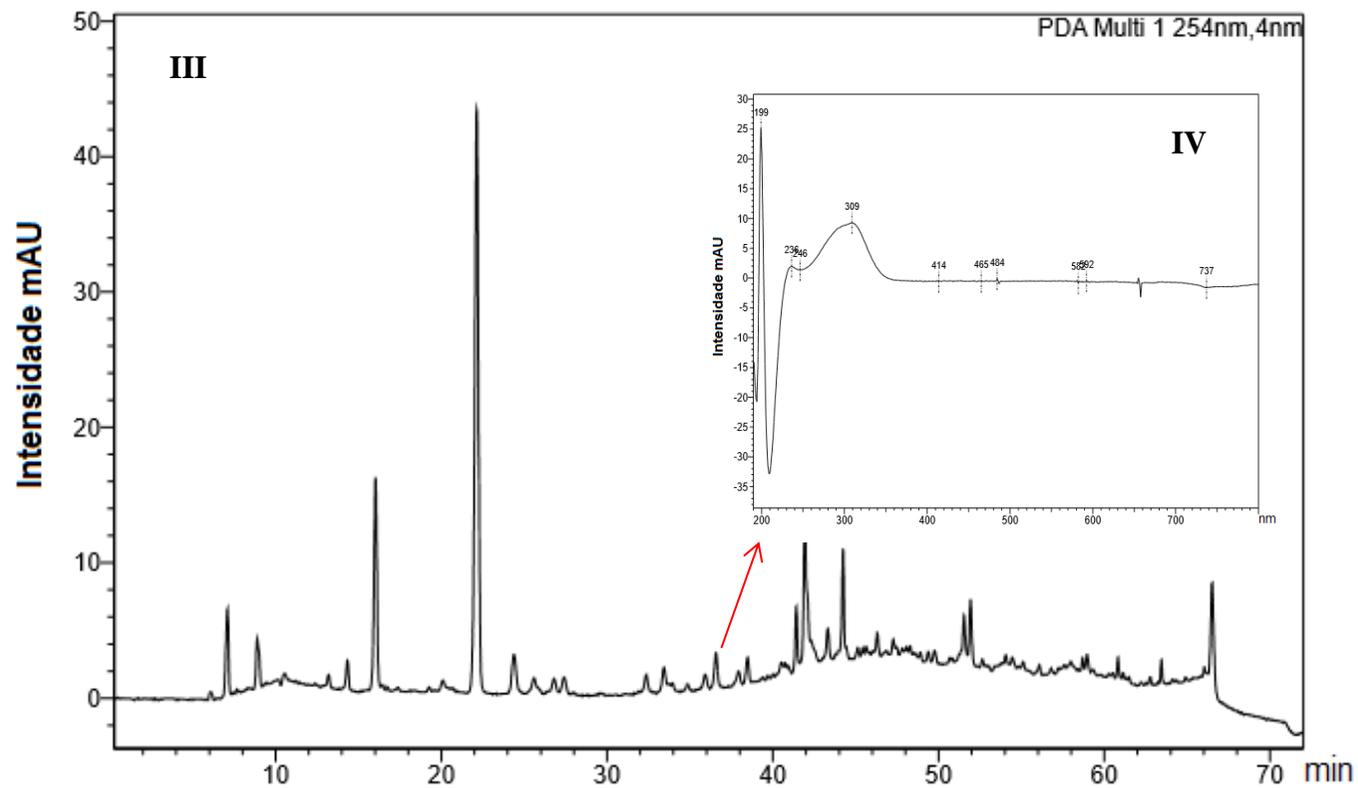


Apêndice A - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido clorogênico (continua)



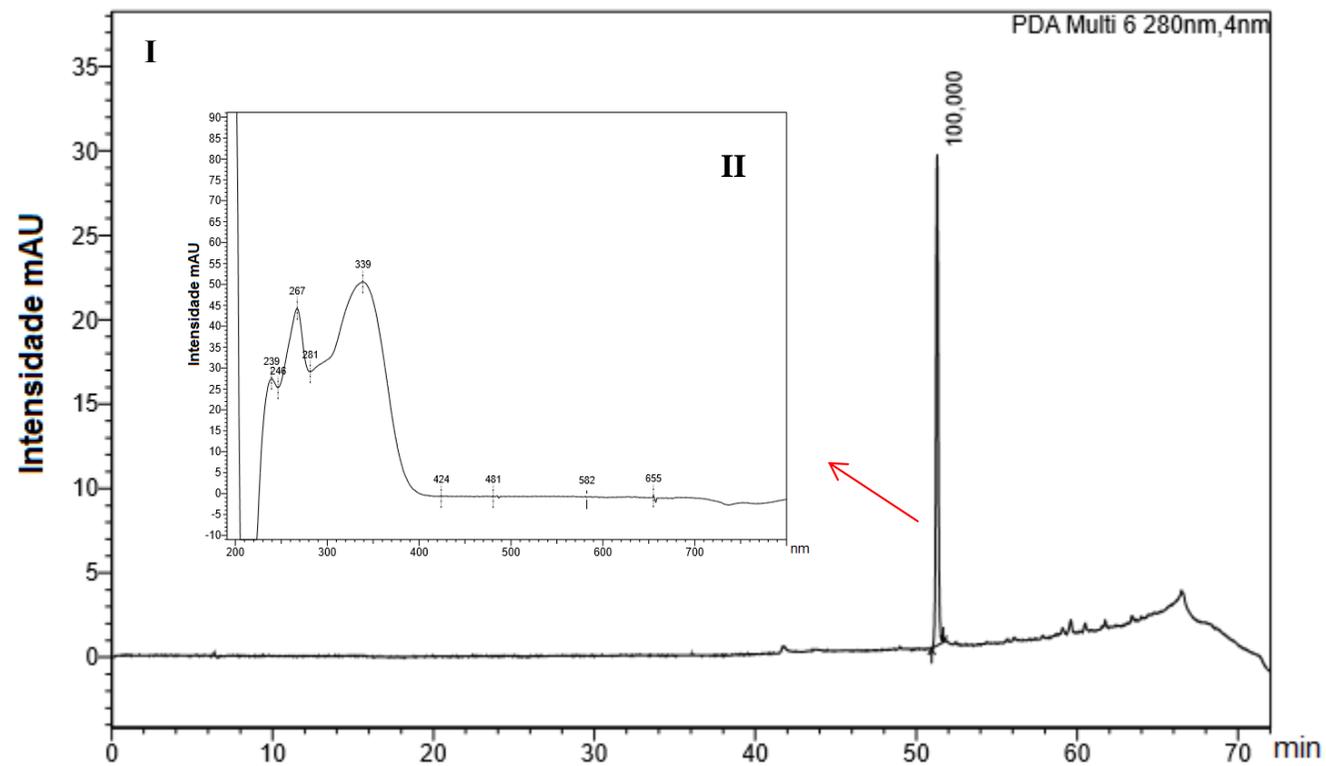
Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão ácido clorogênico, II = espectro UV-DAD do padrão ácido clorogênico, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD ácido clorogênico da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice B - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido ρ -coumárico

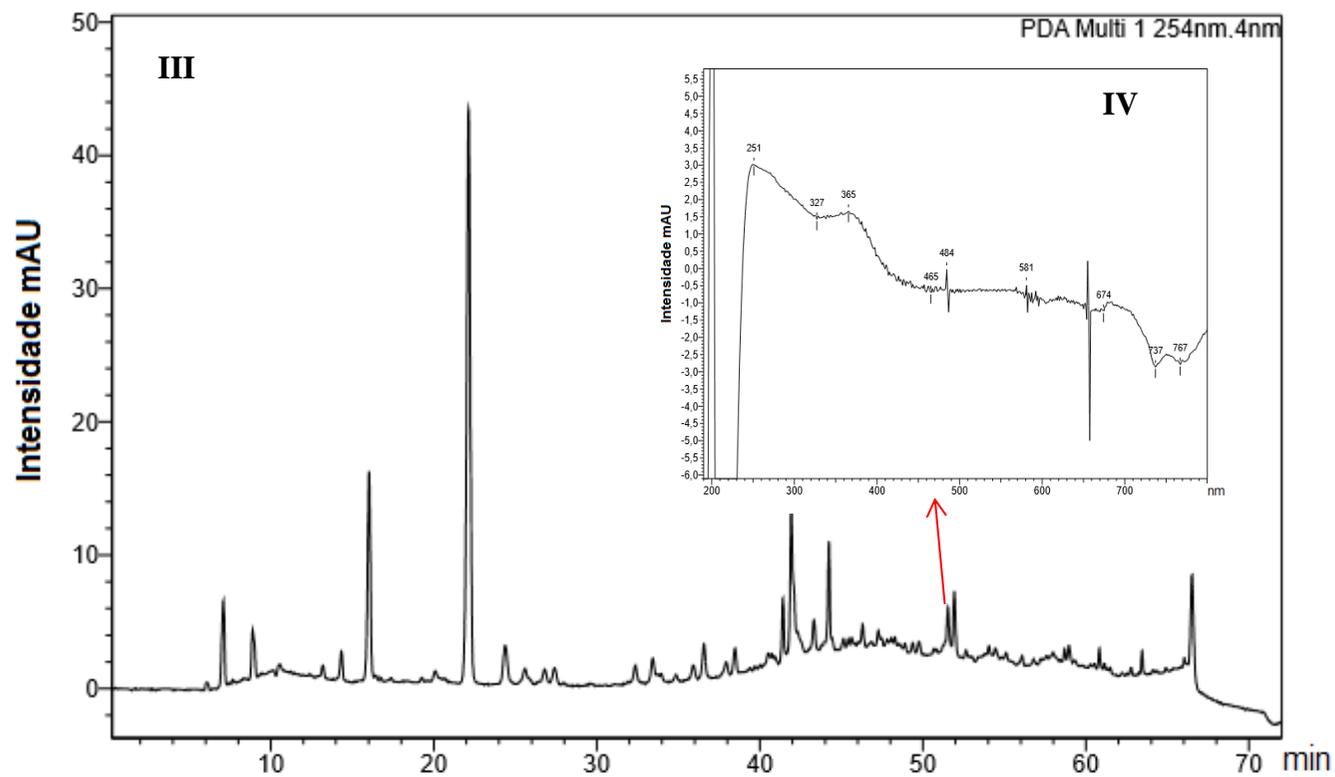
Apêndice B - Cromatograma e espectro UV-DAD do ácido p -coumárico (continua)

Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão ácido p -coumárico, II = espectro UV-DAD do padrão ácido p -coumárico, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD p -coumárico da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice C - Cromatograma e espectro UV-DAD da apigenina

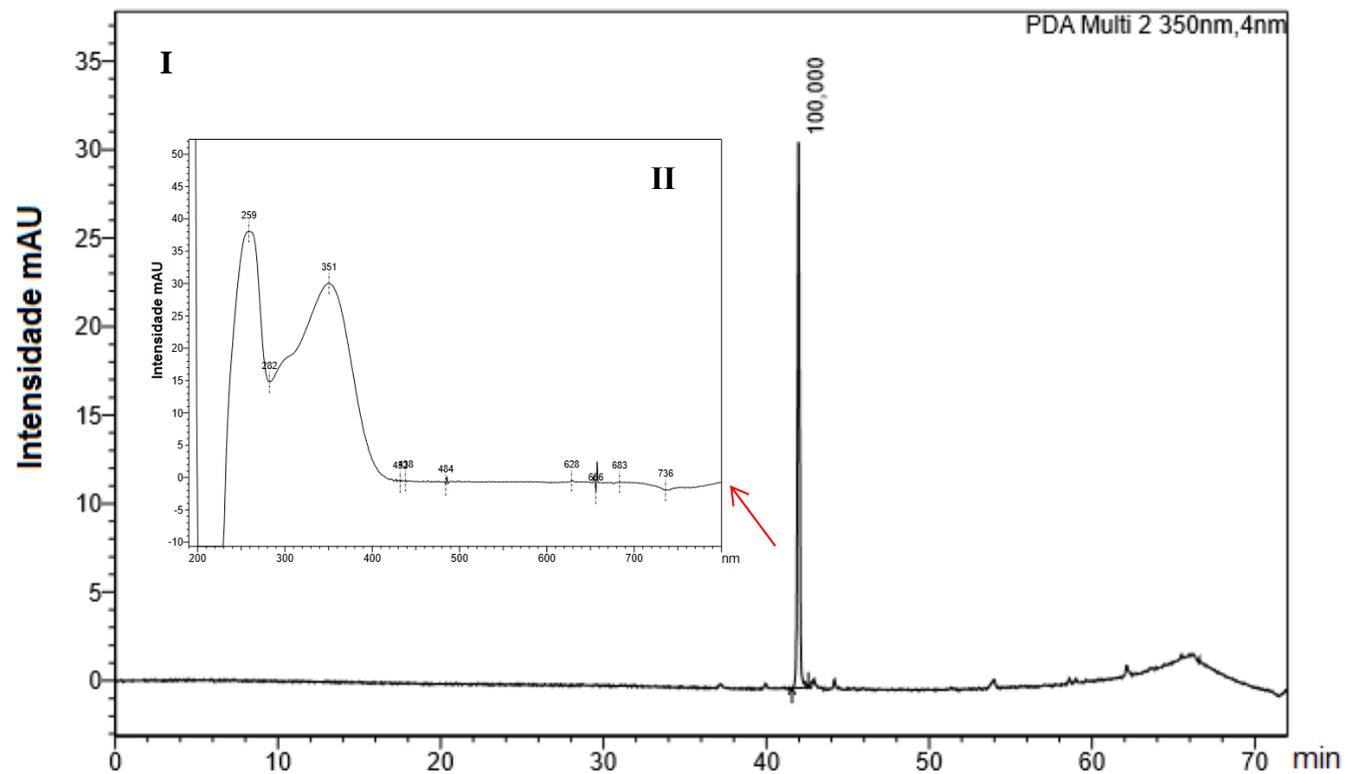


Apêndice C - Cromatograma e espectro UV-DAD da apigenina (continua)

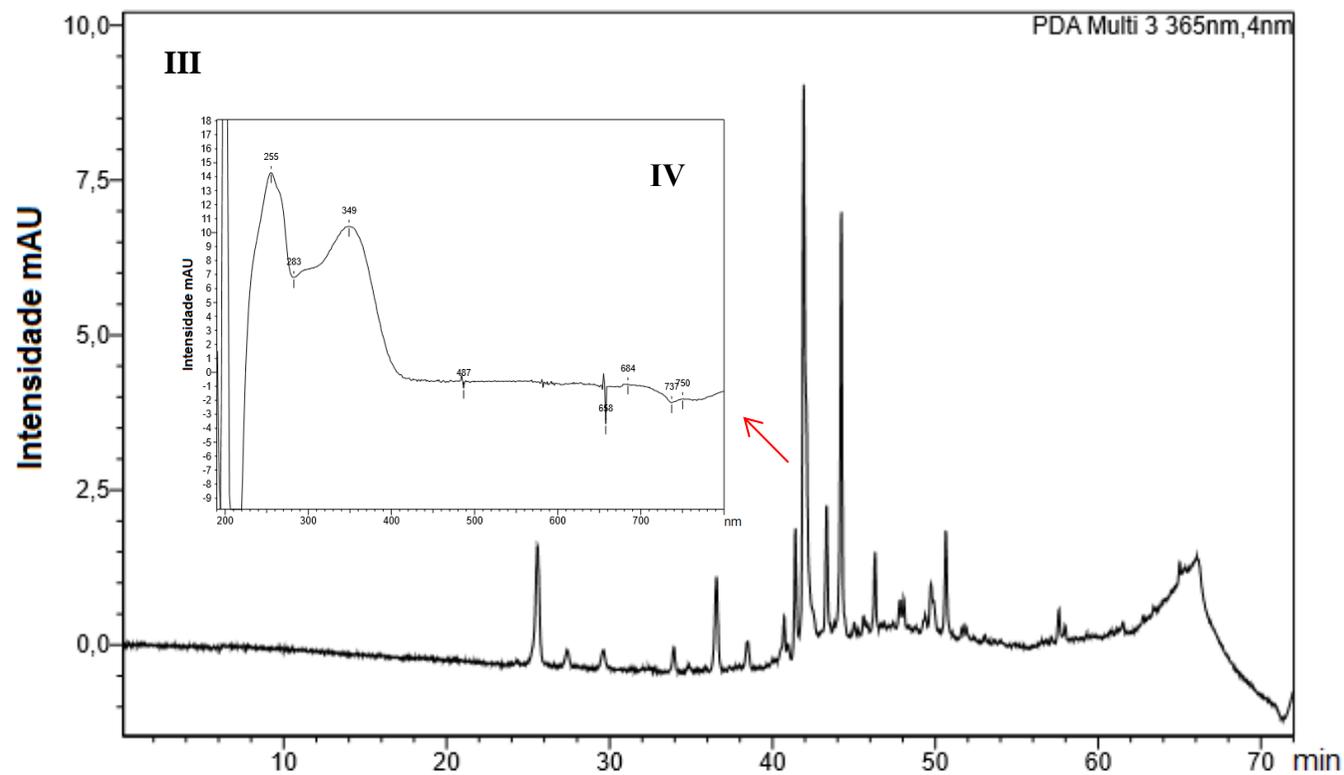


Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão apigenina, II = espectro UV-DAD do padrão apigenina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD apigenina da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice D - Cromatograma e espectro UV-DAD da myricitrina

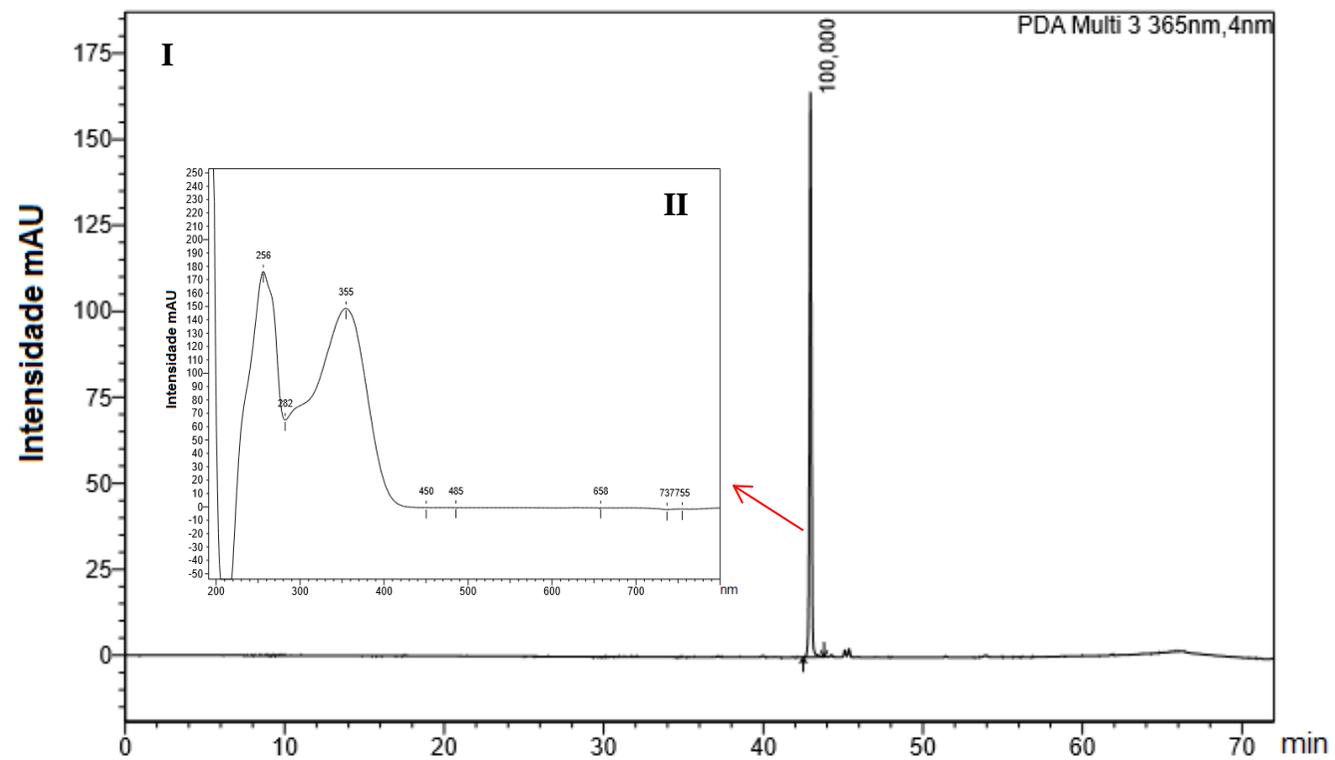


Apêndice D - Cromatograma e espectro UV-DAD da myricitrina (continua)

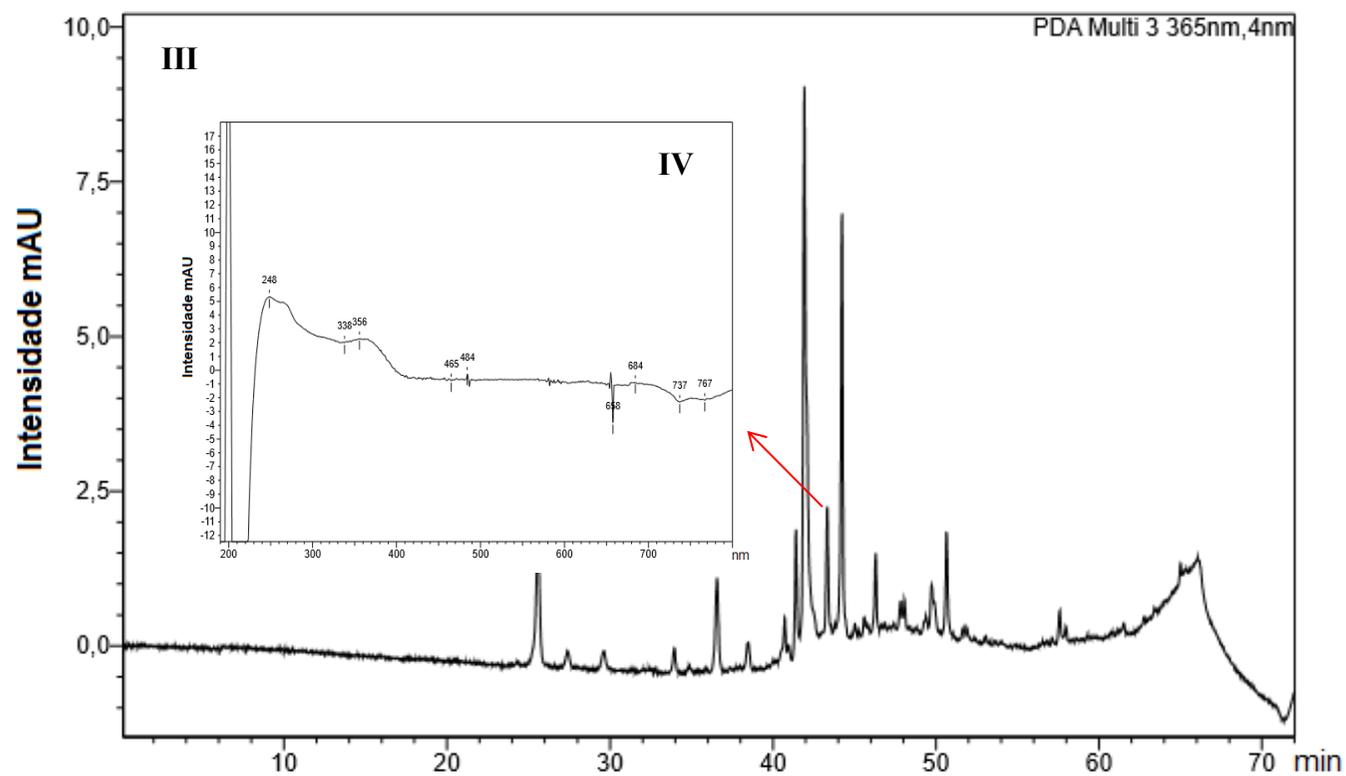


Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão myricitrina, II = espectro UV-DAD do padrão myricitrina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD myricitrina da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice E - Cromatograma e espectro UV-DAD da rutina

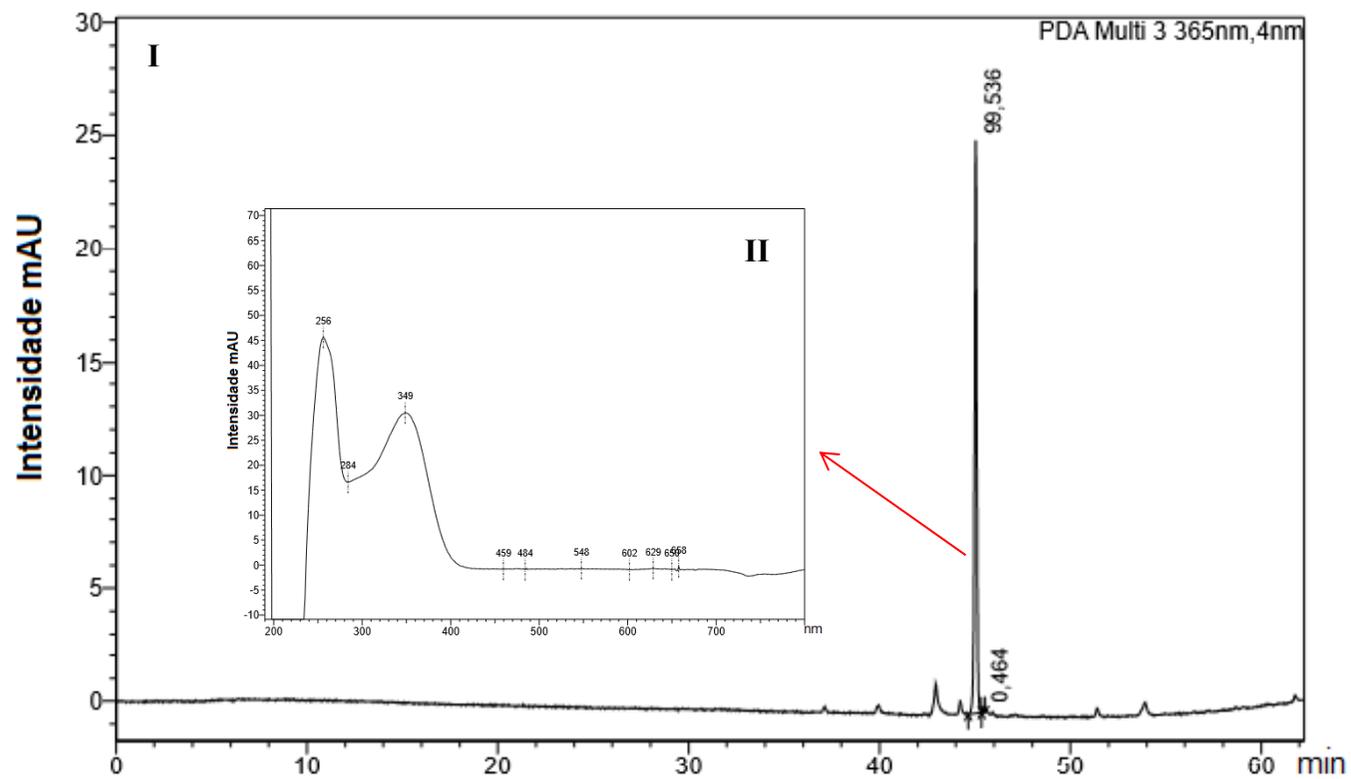


Apêndice E - Cromatograma e espectro UV-DAD da rutina (continua)

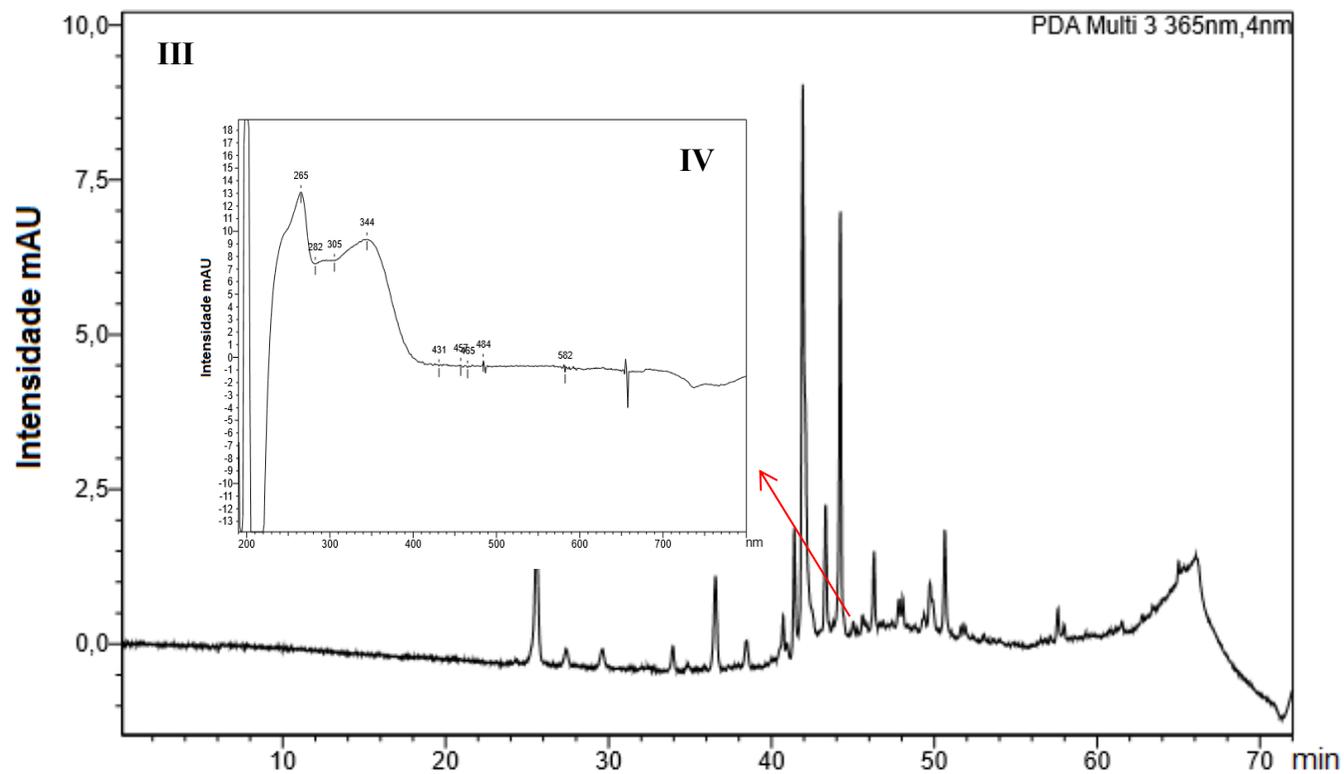


Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão rutina, II = espectro UV-DAD do padrão rutina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD rutina da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice F - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercitrina

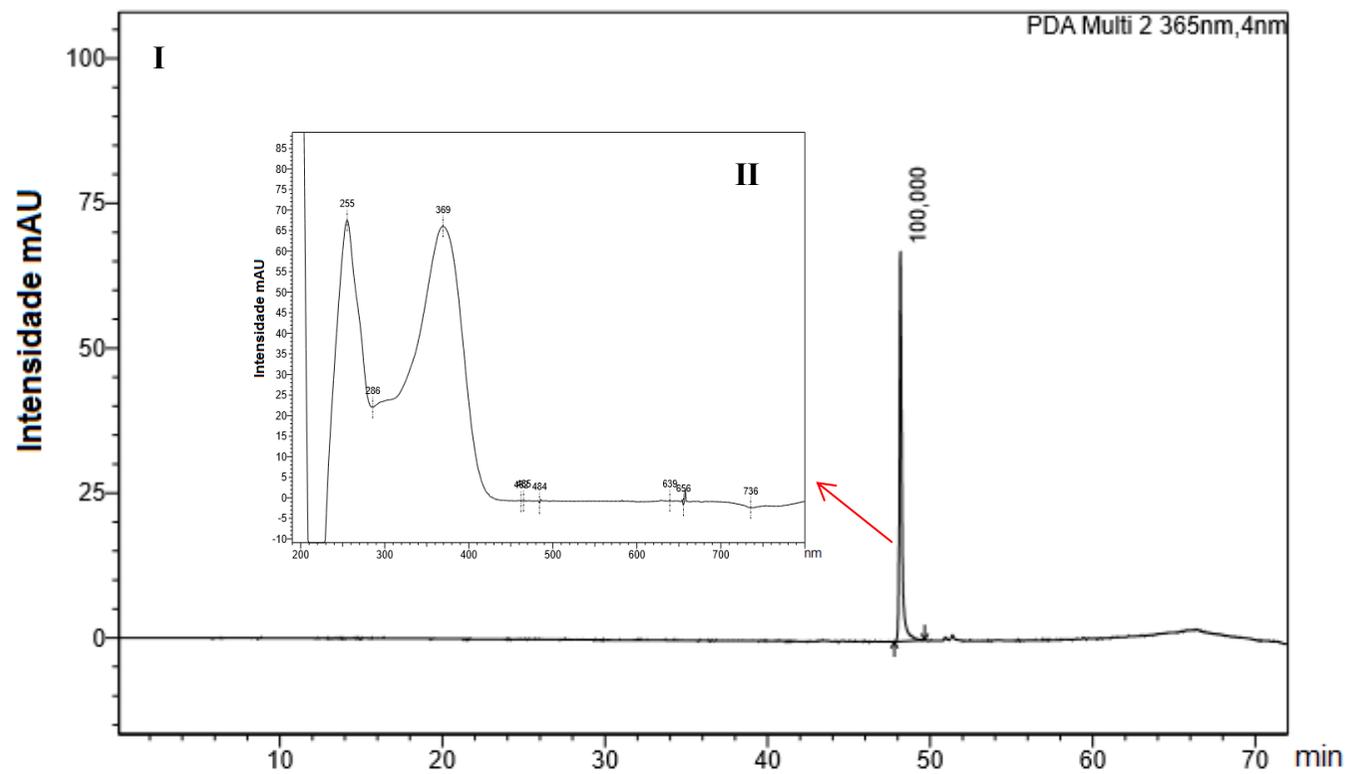


Apêndice F - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercitrina (continua)

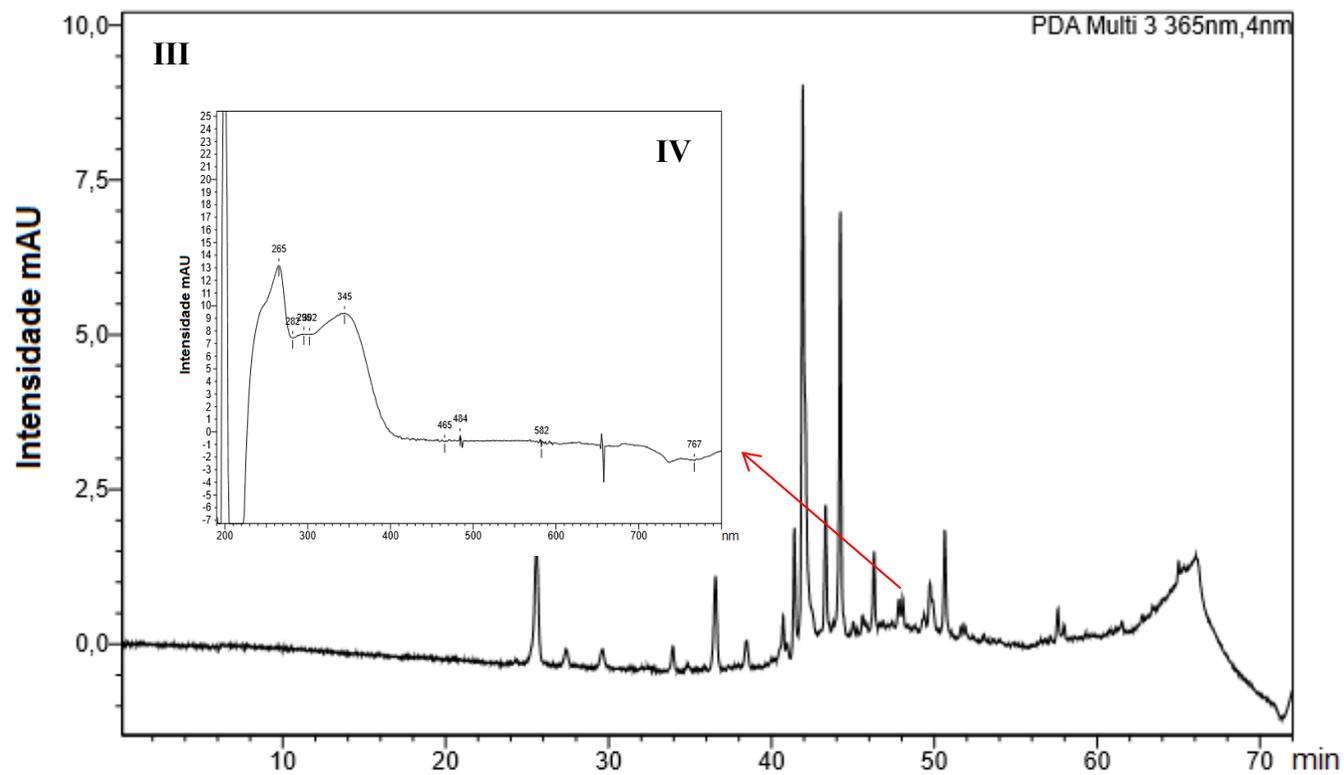


Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão quercitrina, II = espectro UV-DAD do padrão quercitrina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD quercitrina da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice G - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercetina

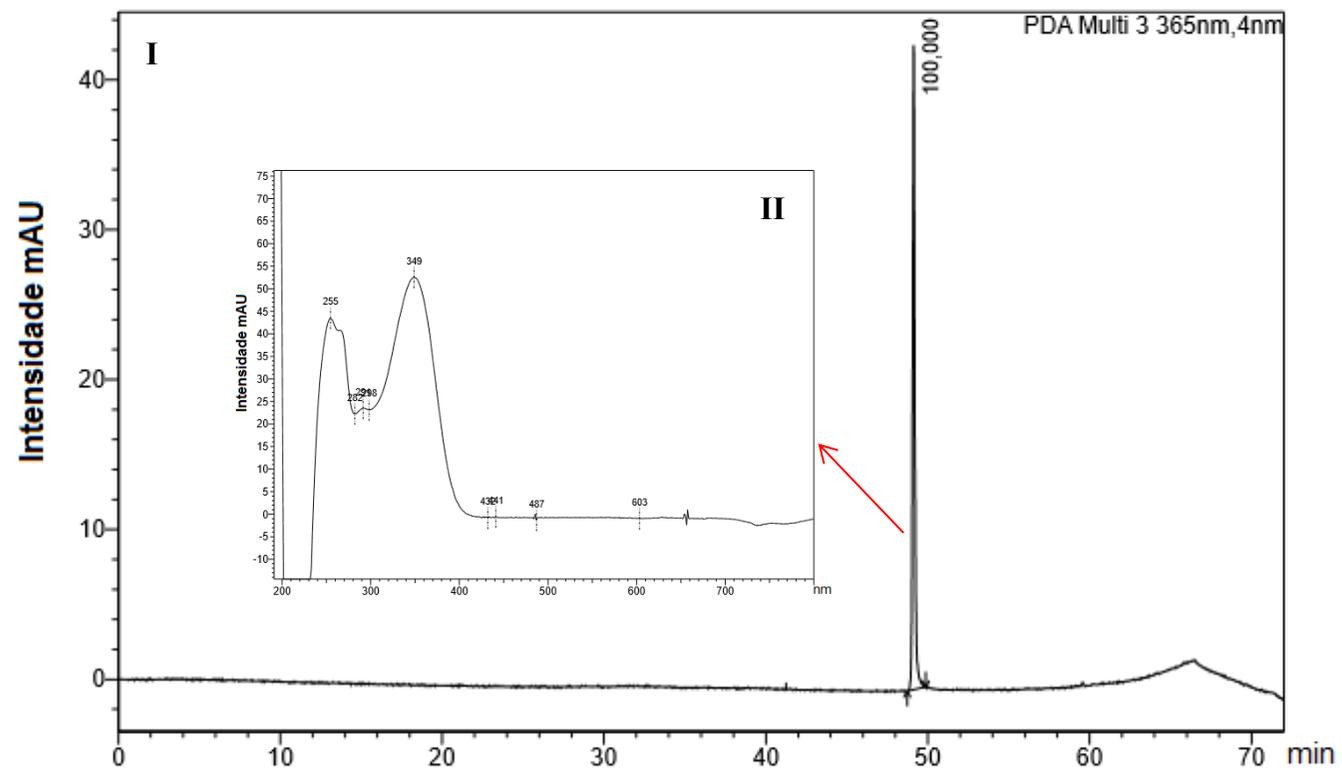


Apêndice G - Cromatograma e espectro UV-DAD da quercetina (continua)

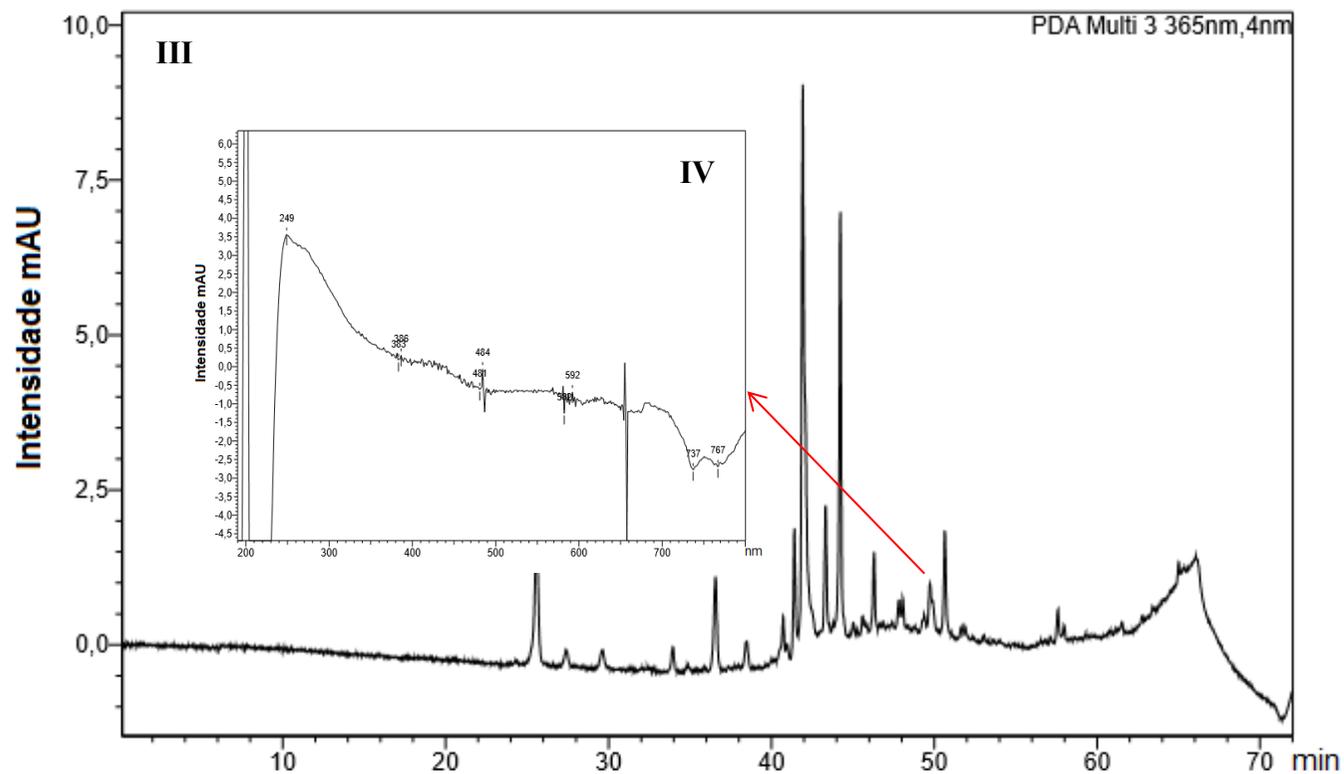


Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão quercetina, II = espectro UV-DAD do padrão quercetina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD quercetina da fração acetato de etila da cavalinha.

Apêndice H - Cromatograma e espectro UV-DAD da luteolina



Apêndice H - Cromatograma e espectro UV-DAD da luteolina (continua)



Fonte: Autora, 2017. I = cromatograma do padrão luteolina, II = espectro UV-DAD do padrão luteolina, III = cromatograma fração acetato de etila cavalinha, IV = espectro UV-DAD luteolina da fração acetato de etila da cavalinha.