

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pre-
faciais, em branco no arquivo original
enviado pela autora

“O QUE FOR TEU DESEJO, ASSIM SERÁ TUA VONTADE. O QUE FOR TUA VONTADE, ASSIM SERÃO TEUS ATOS. O QUE FOREM TEUS ATOS, ASSIM SERÁ TEU DESTINO”.

(DEEPAK CHOPRA)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	16
1.1- Plantas medicinais e fitoterápicos	17
1.2- Ensaio biológicos	20
1.2.1- Atividade antimicrobiana	20
1.2.1.1- Micro-organismos.....	21
1.2.1.1.1- Micro-organismos Gram- positivos.....	22
1.2.1.1.2- Micro-organismos Gram- negativos.....	23
1.2.1.1.3- Leveduras	24
1.2.1.1.4- Fungos dermatófitos	25
1.2.1.1.5- Micro-organismos bucais	27
1.2.2- Atividade antioxidante.....	28
1.2.3- Avaliação da citotoxicidade.....	30
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
2.2- <i>Equisetum hyemale</i> L. (Equisetaceae)	33
3- OBJETIVO.....	36
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1- Material	39
4.1.1- Solventes, reagentes e meios de cultura	39
4.1.2- Equipamentos	42
4.2- Métodos.....	44
4.2.1- Coleta do material vegetal	44
4.2.2- Obtenção da droga vegetal	45
4.2.3- Análises físico-químicas da droga vegetal	45
4.2.3.1- Determinação do pH	45
4.2.3.2- Determinação do teor de umidade.....	45
4.2.3.3- Determinação da perda por secagem.....	46
4.2.3.4- Determinação do teor de extrativos	46
4.2.3.5- Determinação do teor de cinzas totais	46

4.2.4- Análises microbiológicas.....	47
4.2.4.1- Contagem do número total de micro-organismos	47
4.2.4.2- Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	47
4.2.4.3- Pesquisa de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	48
4.2.5- Triagem fitoquímica preliminar.....	48
4.2.5.1- Pesquisa de Alcalóides	49
4.2.5.2- Pesquisa de Antraquinonas	49
4.2.5.2.1- Antraquinonas livres	49
4.2.5.2.2- Antraquinonas heterosídicas.....	49
4.2.5.3- Pesquisa de Flavonóides	50
4.2.5.3.1- Reação de Shinoda	50
4.2.5.3.2- Reação de Taubock.....	50
4.2.5.3.3- Reação de Pew	51
4.2.5.3.4- Reação do cloreto férrico	51
4.2.5.3.5- Reação do cloreto de alumínio	51
4.2.5.4- Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos	51
4.2.5.4.1- Reação de Legal	52
4.2.5.4.2- Reação de Kedde	52
4.2.5.4.3- Reação de Pesez.....	53
4.2.5.4.4- Reação de Keller- Killiani.....	53
4.2.5.4.5- Reação de Liebermann-Burchard.....	53
4.2.5.5- Pesquisa de Saponinas	53
4.2.5.6- Pesquisa de Taninos.....	54
4.2.5.6.1- Reação da gelatina.....	54
4.2.5.6.2- Reação com sais de ferro	54
4.2.5.6.3- Reação com acetato de chumbo	54
4.2.6- Obtenção de derivados vegetais de <i>E. hyemale</i>	54
4.2.7- Análises fitoquímicas dos extratos	55
4.2.7.1- Perfil cromatográfico dos extratos de <i>E. hyemale</i> em CCD.....	55
4.2.7.2- Espectrofotometria na região de UV.....	56
4.2.8- Teste de hemólise	57

4.2.9- Determinação da atividade antimicrobiana	57
4.2.9.1- Método de difusão em ágar	57
4.2.9.1.1- Linhagens de micro-organismos.....	57
4.2.9.1.2- Diluição dos extratos de <i>E. hyemale</i>	58
4.2.9.1.3- Preparo do inóculo.....	58
4.2.9.1.4- Preparo dos controles	59
4.2.9.1.5- Técnica com “templates”	59
4.2.9.2- Método de determinação da CIM.....	60
4.2.9.2.1- Linhagens de micro-organismos.....	60
4.2.9.2.2- Diluição dos extratos de <i>E. hyemale</i>	61
4.2.9.2.3- Preparo do inóculo.....	61
4.2.9.2.4- Preparo dos controles	62
4.2.9.2.5- Técnica de microdiluição em caldo	62
4.2.9.2.6- Método de determinação da CBM e CFM.....	66
4.2.10- Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres	66
4.2.11- Avaliação da citotoxicidade.....	67
4.2.11.1- Preparo das amostras	68
4.2.11.2- Procedimento.....	68
5- RESULTADOS	70
5.1- Obtenção da droga vegetal.....	71
5.2- Análises físico-químicas da droga vegetal.....	71
5.3- Análises microbiológicas	71
5.4- Triagem fitoquímica preliminar	72
5.5- Obtenção de extratos de <i>E. hyemale</i>	73
5.6- Análises fitoquímicas dos extratos.....	74
5.6.1- Perfil cromatográfico de <i>E. hyemale</i> para fenóis.....	74
5.6.2- Perfil cromatográfico de <i>E. hyemale</i> para saponinas.....	75
5.6.3- Espectrofotometria na região de UV	76
5.7- Teste de hemólise.....	77
5.8- Determinações da atividade antimicrobiana	78
5.8.1- Método de difusão em ágar	78

5.8.2- Método de CIM, CBM e CFM.....	81
5.9- Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres.....	84
5.10- Avaliação da citotoxicidade	85
6- DISCUSSÃO.....	86
7- CONCLUSÃO	98
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Equisetum hyemale</i>	35
Figura 2- Esquematização do preparo dos extratos e dos inóculos para o teste da determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM.....	65
Figura 3- Fotografia de <i>Equisetum hyemale</i> coletada no Horto UNESP	71
Figura 4- Cromatoplaça dos extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i> para observação de fenóis	76
Figura 5- Cromatoplaça dos extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i> para observação de saponinas	77
Figura 6: Espectrofotometria na região de ultravioleta.....	78
Figura 7: Capacidade de hemólise dos extratos de <i>E. hyemale</i>	79
Figura 8: Halos de inibição do teste de difusão em ágar com “templates”	80
Figura 9- Fotografia representativa da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da CIM frente a bactérias.....	84
Figura 10- Fotografia representativa da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da CIM frente <i>C.albicans</i>	84
Figura 11- Fotografia representativa da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da CIM frente aos fungos dermatófitos.....	84
Figura 12- Atividade antioxidante da substância padrão e dos extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i>	85
Figura 13- Desempenho da atividade citotóxica dos extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i> em diferentes concentrações, frente a fibroblastos e macrófagos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análises físico-químicas para a droga vegetal de <i>E. hyemale</i>	72
Tabela 2- Controle de qualidade microbiológico da droga vegetal de <i>E. hyemale</i>	73
Tabela 3- Metabólitos secundários encontrados em <i>E. hyemale</i>	74
Tabela 4- Massas dos derivados vegetais obtidos de <i>E. hyemale</i>	75
Tabela 5- Medida dos halos de inibição do teste de difusão em ágar, a partir da média de triplicatas, para os extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i>	80
Tabela 6- Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico 70% e metanólico de <i>E. hyemale</i> , a partir da média de triplicatas.....	82
Tabela 7- Resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à micro-organismos bucais. Os valores expressos representam a média de triplicatas	83

ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain heart infusion

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EMB: eosina-azul de metileno

EtOH 70%: extrato etanol 70%

MeOH: metanol

MOPS: ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico

MH: Müeller Hinton

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NP/PEG: *natural products/polyethyleneglicol*

p/p: peso por peso

Rf: fator de retenção

SDS: dodecil sulfato de sódio

TSB: triptona de soja

TSI: tríplice açúcar - ferro

TTC: cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UV: ultravioleta

v/v: volume por volume

WHO: World Health Organization

XLD: xilose-lisina-desoxicolato

IC: Índice de Citotoxicidade

IC₅₀: Índice de Citotoxicidade para 50% de células

RESUMO

São muitas as tentativas de se obter novas fontes de moléculas capazes de atuarem a favor da saúde humana combatendo problemas de saúde pública, especialmente a partir de espécies vegetais. Procurou-se estabelecer neste trabalho parâmetros farmacognósticos relacionados à caracterização inicial da droga vegetal de *Equisetum hyemale*. O espécime de *E. hyemale* foi coletado no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Estudos preliminares com a droga vegetal mostraram a presença de metabólitos secundários de maior polaridade. Os extratos etanólico 70% e metanólico foram obtidos por percolação e submetidos a estudos fitoquímicos realizados utilizando-se reações gerais de identificação e métodos Cromatográficos em Camada Delgada (CCD). Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em ágar com “templates” e pelo método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo, frente a cepas bacterianas e fúngicas. O potencial de atividade antioxidante dos extratos foi determinado baseando-se na atividade sequestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Os ensaios para atividade citotóxica foram realizados frente a linhagens de células eucarióticas *in vitro*. Os resultados obtidos no estudo fitoquímico mostraram a presença de compostos fenólicos e saponinas em ambos os extratos que apresentaram atividade antifúngica e frente à micro-organismos bucais segundo a técnica de microdiluição em caldo. Os ensaios com DPPH demonstraram que os extratos tem capacidade sequestrante de radicais livres. Os testes de citotoxicidade revelaram que o extrato etanólico 70% apresentou baixa citotoxicidade na maior concentração testada (2000 µg/mL) frente a fibroblastos enquanto que frente a macrófagos causou 50% de morte celular nesta mesma concentração, o extrato metanólico mostrou citotoxicidade de 50% na faixa de 1000-2000 µg/mL frente a ambos os tipos celulares.

Palavras chave: *Equisetum hyemale*, fitoquímica, atividade biológica.

ABSTRACT

There are many attempts to obtain new sources of molecules that have the capacity of acting in favor of human health resolve public health problems, especially from plant species. This study aimed to establish pharmacognostic parameters to characterize the drug of *Equisetum hyemale*. *E. hyemale* were collected at "Horto de Plantas Mediciniais e Tóxicas de Araraquara". The preliminary characterization reactions showed the presence of secondary metabolites of higher polarity in the drug and the extracts 70% ethanol and methanol were obtained by percolation, and submitted to phytochemical studies performed using methods for identification and Thin Layer Chromatography (TLC). The tests for antimicrobial activity were performed by agar diffusion with templates and broth microdilution methods, was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values against bacterial and fungal strains. The extracts antioxidant potential was determined based on the activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) activity scavenging. The cytotoxicity assays were performed against eukaryotic cell lines *in vitro*. The results showed the presence of phenolic compounds and saponins in both extracts. The extracts showed antifungal activity and against oral micro-organisms by microdilution method. The tests with DPPH showed that both extracts have an antioxidant activity compared with literature. Ethanolic extract showed low cytotoxicity at the highest evaluated concentration (2000 µg/mL) against fibroblastic while against macrophages caused 50% cell death at the same concentration, the methanolic extract caused 50% cell death at the concentration in between 1000-2000 µg/mL against both cells.

Keywords: *Equisetum hyemale*, phytochemical, biological activitie.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Plantas medicinais e fitoterápicos

Plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar, um processo fisiológico ou patológico ou ainda como fonte de fármacos e de seus precursores, enquanto que medicamentos fitoterápicos são produtos medicinais acabados, cujos ingredientes ativos são formados por partes de plantas, plantas inteiras ou outro material vegetal em forma de preparações farmacêuticas. Portanto, são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (WHO, 1993; BRASIL, 2004; BRASIL, 2010).

A utilização das plantas no combate as doenças é tão antigo quanto à própria humanidade. Produtos naturais tem sido a maior fonte de sucesso para a descoberta de novos agentes terapêuticos (OLIVEIRA e AKISUE, 1995).

As crenças populares são consideradas o ponto de partida para o conhecimento científico. A partir delas, supõe-se que foram desenvolvidos mais de 70% dos medicamentos derivados de plantas. Apesar de haver contrapontos entre o conhecimento científico e o saber popular, a constante integração entre esses saberes contribui muito nas descobertas de novos conhecimentos, auxiliando os pesquisadores na busca da cura para diversas doenças (CAPONI et al., 2003).

Atualmente, observa-se no Brasil um crescimento significativo na utilização de fitoterápicos, que se explica pelos avanços ocorridos na área científica que permitiram um maior desenvolvimento nessa área, assim como uma forte tendência de procura, pela população, por terapias mais acessíveis financeiramente (YUNES e VALDIR FILHO, 2001).

Inegavelmente, os fitoterápicos têm um papel importante na terapêutica, contudo, seu emprego nem sempre segue as normas no que diz respeito aos requisitos de eficácia e segurança, uma vez que são produtos de venda livre e, desta forma estão diretamente ligados à automedicação (BRASIL, 2004).

No Brasil os fitoterápicos são empregados basicamente em concordância com práticas tradicionais pela população nativa ou trazidas ao país por imigrantes, tanto em áreas rurais quanto urbanas. Considerando a riqueza da flora brasileira o emprego destes recursos terapêuticos requer mais que conhecimento tradicional, deveria haver o acúmulo de conhecimento científico que permitisse a transformação das plantas medicinais em medicamentos industrializados (RATES, 2001).

Os principais problemas enfrentados para a implementação da fitoterapia no Brasil são os socioculturais e econômicos além da falta de estudos organizados e integrados que não permitiram ainda a transposição dos recursos disponíveis na biodiversidade brasileira ao moderno conceito de fitoterápicos (RATES, 2001).

O uso seguro e eficaz de fitoterápicos envolve algumas etapas importantes como: estudos de identificação botânica, análises físico-químicas, microbiológicas e triagem fitoquímica para a padronização de matérias-primas e do produto acabado, como testes preliminares para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento. Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal (BRANDÃO et al., 2002; CHOI et al., 2002; BAST et al., 2002; MELO et al., 2004), a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas a base de plantas ainda são escassos na literatura (VAN BEEK e WINTERMANS, 2001; WANG e YAO e ZENG, 2003; BARA e CIRILO

e OLIVEIRA, 2004).

As análises físico-químicas ou de pureza identificam a presença de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar contaminando a droga vegetal. O controle microbiológico deve ser realizado devido ao fato dos materiais vegetais conterem um grande número de fungos e bactérias, pertencentes à sua microflora natural ou mesmo introduzidas durante a manipulação, contaminação esta que pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário (SONAGLIO et al., 2003).

Segundo Araújo e Ohara (2000), investigações da qualidade microbiológicas de drogas vegetais e produtos delas obtidos realizadas em outros países, mostraram índices de contaminação microbiana em desacordo com normas internacionalmente aceitas para medicamentos (LENOBLE et al., 1980; CORTEZ et al., 1986; FAVET, 1992; KEDZIA, 1995; MARTINS et al., 2001; KNEIFEL et al., 2002). No Brasil, avaliações de fitoterápicos comercializados em farmácias apresentaram resultados semelhantes (FISCHER e SAITO, 1988; FISCHER et al., 1993; SANTOS et al., 1995).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos ou avaliar a presença destes nas espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes. Essa abordagem permite obter informações preliminares a partir de testes fitoquímicos qualitativos ou quantitativos para classes de substâncias como: flavonóides, alcalóides, esteróides, terpenos, taninos, saponinas entre outras (SIMÕES, 2001).

1.2- Ensaio biológicos

1.2.1- Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser avaliada atualmente por vários métodos, sendo que os mais empregados incluem método de difusão em ágar e diluição em caldo.

O teste de difusão em ágar é considerado um método físico pelo fato de um micro-organismo ser colocado em contato com a substância a ser avaliada, em meio de cultura sólido. O resultado é interpretado pela relação entre o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo e a concentração da substância em teste e é ainda comparado a um padrão de referência, a medida de inibição se refere à zona ou o halo de inibição de crescimento partindo-se da circunferência do disco ou poço até a margem onde há crescimento de micro-organismos (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2007). Este método apresenta algumas limitações como o fato de poder ser realizado somente com micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. Neste método a aplicação da substância antimicrobiana pode ser realizada de diferentes maneiras como por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou perfuração em ágar (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2007).

A relação encontrada entre o crescimento do micro-organismo observada pela densidade da turbidez em meio líquido e a concentração da substância avaliada é realizada por meio do método de diluição em caldo, utilizando-se também um padrão de referência para comparação (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2007). Considerado um método que fornece resultados quantitativos este não sofre influência da velocidade de crescimento dos micro-organismos (OSTROSKY et al.,

2007).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998 que utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Esta técnica de diluição em microplacas foi utilizada primeiramente para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais, o autor observou, porém que células de alguns micro-organismos se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão, que alguns extratos precipitavam e ainda que a clorofila em concentrações altas interferia na análise devido sua coloração verde. No entanto Eloff (1998), concluiu que o método de microdiluição é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, além de ser barato, ter reprodutibilidade e necessitar de pequena quantidade de amostra, podendo também ser usado para avaliar grande número de diferentes substâncias (OSTROSKY et al., 2007).

O conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução dos métodos de difusão e de diluição evitam que ocorram erros na interpretação dos resultados obtidos, já que diversos são os fatores que interferem. Dentre estes destaca-se: meios de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo, condições de incubação e espessura e uniformidade do ágar (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2007).

1.2.1.1- Micro-organismos

Inúmeros são os casos de morbidade e mortalidade relacionados a diferentes grupos microbianos. Dentre os micro-organismos envolvidos nesses eventos destaca-se a importância de algumas espécies ligadas a diferentes formas de infecção e ainda

ao surgimento de isolados resistentes que vem causando sérios problemas de saúde pública.

1.2.1.1.1- Micro-organismos Gram-positivos

O aumento das infecções por micro-organismos Gram-positivos tem sido destaque nos últimos anos. A predominância desse grupo nas diversas infecções tem chamado atenção por um perfil de sensibilidade reduzido para diferentes antimicrobianos, trazendo frequentemente dilemas terapêuticos durante a prática clínica (FRIDKIN, 2001).

Staphylococcus aureus são considerados micro-organismos oportunistas e frequentemente estão associados a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, causando infecções como celulite, impetigo e feridas em diversos sítios sendo agudas ou piogênicas, disseminando-se para diferentes tecidos e provocando focos metastáticos (CDC, 2001; FRIDKIN, 2001). Portadores nasais e pacientes colonizados por estas bactérias têm sido descritos como fatores de risco para o desenvolvimento de infecções (DEPARDIEU et al., 2003). Atualmente, *S. aureus* resistente a meticilina é o patógeno mais encontrado em infecções e é responsável por inativar a ação de vários antibióticos, tornando a multirresistência, um grande problema de saúde pública (STRATTON, 2000; GELATTI et al., 2009).

Considerado um micro-organismo relativamente inócuo devido ao fato de fazer parte da microbiota normal da pele, o *Staphylococcus epidermidis* ganhou interesse significativo nos últimos anos e se tornou um patógeno de importância, especialmente em pacientes imunocomprometidos, por causar infecções que levam à destruição das barreiras das mucosas permitindo o acesso a corrente sanguínea,

sendo a principal causa de infecções ligadas a implantes de dispositivos médicos (LOWY, 1998; DOMINGO e FONTANET, 2001; ZIEBUHR, 2001; VUONG e OTTO, 2002; MASSEY et al., 2006).

Tanto as espécies *S. aureus* como *S. epidermidis* são conhecidos pela sua capacidade de formar biofilmes. Esses biofilmes formados em tecidos ou em dispositivos médicos dificultam a atuação do medicamento e eliminação desses micro-organismos (GOTZ, 2002; FITZPATRIC et al., 2005; O'GARA, 2007; MACCANN et al., 2008).

Os bacilos Gram-positivos, formadores de esporos, como *Bacillus subtilis*, são resistentes a condições ambientais adversas e são considerados patógenos oportunistas, geralmente isolados em pacientes sob o uso de próteses, imunocomprometidos, em infecções oculares e do sistema nervoso central por introdução traumática (ZEIGLER, 2008).

1.2.1.1.2- Micro-organismos Gram-negativos

Os micro-organismos Gram-negativos são de grande importância microbiológica e médica devido às infecções que causam e também devido ao surgimento de isolados resistentes aos antimicrobianos utilizados na terapêutica (ABOTT, 2003; MURRAY et al., 2004).

A enterobactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo com cepas encontradas como habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos, normalmente encontrado nas fezes destes. Porém está relacionada a inúmeras infecções tanto da comunidade como hospitalares e em pacientes imunocomprometidos, é o micro-organismo mais frequente em infecções urinárias e

ocorre em cerca de 80% a 90% das infecções bacterianas agudas não-complicadas (MURRAY et al., 2004). O surgimento de diferentes grupos de *E. coli* relacionados com surtos de infecção e distúrbios gastrointestinais vem conduzindo a estudos que os classificam de acordo com propriedades de virulência; sorotipos; interações com a mucosa intestinal; síndrome clínica e epidemiologia, com prevalência principalmente entre crianças (REED, 1994; STAMM e NORRBY, 2001; KAPER, 2005; WEINTRAUB, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo caracterizado por sua intrínseca resistência a uma variedade de antimicrobianos e é um dos agentes mais relacionados a infecções oportunistas em pacientes hospitalizados, principalmente em pacientes que frequentam unidades de terapia intensiva (STOVER et al., 2000; PARKINS et al., 2010), além de ser a causadora de pneumonias, está associada a taxas significativas de mortalidade no caso de septicemias (ROY-BURMAN et al., 2001; UNAL et al., 2004). A emergência de isolados multirresistentes traz um risco potencial à atual terapêutica, sendo considerado um problema global (HANCOCK e SPEERT, 2000; PARKINS et al., 2010).

1.2.1.1.3- Leveduras

Infecções sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são frequentes no hospedeiro imunocomprometido, com aproximadamente 20 espécies reconhecidamente patogênicas destacando-se *Candida albicans* (NEVES et al., 2002; COLOMBO e GUIMARAES, 2003), sendo considerada de difícil diagnóstico com altas taxas de morbidade e mortalidade, apesar das terapias antifúngicas (RICHARDSON e LASS-FLORL, 2008).

Essa incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado crescente devido à maior agressividade no tratamento de neoplasias, transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), lúpus eritematoso sistêmico (LES), entre outras doenças (NUCCI e MARR, 2005; MACEDO et al., 2008).

Atualmente, podemos evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das leveduras com o surgimento de isolados resistentes aos antifúngicos disponíveis (RICHARDSON e LASS-FLORL, 2008).

C. albicans tem despertado grande interesse das pesquisas na área de saúde devido a associação com infecções oportunistas e ao surgimento de isolados resistentes e formação de biofilmes ou ainda por pertencer à microbiota humana onde sob circunstâncias normais, pode ser encontrada em 80% da população sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase (KUNAMOTO et al., 2005).

1.2.1.1.4- Fungos dermatófitos

As micoses cutâneas são infecções fúngicas localizadas nas camadas superficiais da pele e seus anexos (OLIVEIRA et al., 2006) e podem ser causadas por dermatófitos ou fungos filamentosos não dermatófitos. Estudos epidemiológicos indicam que as micoses cutâneas estão entre as doenças de maior incidência no mundo (PERON et al., 2005), acometendo todas as faixas etárias e gerando gastos de milhões de dólares em tratamentos todos os anos (ABDEL-RAHMAN et al., 2005). Variam quanto às formas clínicas e agentes causais; porém, a maioria dos autores relata como agentes etiológicos mais frequentes os dermatófitos (80-90%), grupo de fungos que afetam tecidos queratinizados de humanos e outros vertebrados

causando infecções (ALMEIDA, et al., 2009). Esse aumento das micoses causadas por fungos dermatófitos tornou-se um importante problema de saúde pública. A disponibilidade de antifúngicos na prática médica é relativamente pequena, algumas vezes, ineficiente e a maioria deles apresenta certa toxicidade (GIROIS et al., 2006).

Atualmente existem cerca de 40 espécies de dermatófitos, divididos em 3 gêneros: *Trichophyton* (cerca de 22 espécies), *Microsporum* (cerca de 17 espécies) e *Epidermophyton* (com 2 espécies). Destacam-se os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* por estarem envolvidos em inúmeras formas de micoses superficiais também conhecidas como tineas.

Trichophyton rubrum é parasita de tecidos queratinizados e causa principalmente lesões na pele e unhas como nos casos de tinea corporis, manuum e em onicomicoses. Possui a capacidade de produzir proteinases, entre outras enzimas, para se utilizar das proteínas do hospedeiro como fonte de nutrientes (LACAZ et al., 1991; WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 2002).

Trichophyton mentagrophytes é o dermatófito mais envolvido nos casos de tineas barbae, causando infecções na área da barba que podem ser de superficiais moderadas a foliculares inflamatórias severas. Está envolvido com maior frequência também nos casos de tinea pedis, causando condições inflamatórias aguda nas solas dos pés e entre os dedos, caracterizadas pela formação de vesículas e pústulas (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Estudos realizados com isolados clínicos de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* mostraram grande variação quanto à susceptibilidade aos antifúngicos disponíveis atualmente no mercado (ALMEIDA et al., 2009).

Microsporum canis está presente principalmente nas tineas capitis, causando infecções no couro cabeludo, sendo que essa infecção pode ser moderada, quase subclínica com eritema leve ou ainda uma reação altamente inflamatória com foliculites, formação de kerion, e áreas extensas de cicatrização e alopecia, às vezes acompanhada por febre (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

A micologia médica tem passado por muitas mudanças. A profilaxia antifúngica e a terapia empírica têm contribuído para alterações epidemiológicas, com a aparição de cepas com resistência secundária aos antifúngicos e a substituição de algumas espécies sensíveis por outras com resistência intrínseca (ESTRELLA e TUDELA, 2002; ROBERTS et al., 2003).

1.2.1.1.5- Micro-organismos bucais

Como a cavidade bucal apresenta ambiente úmido e temperatura constante, favorece o desenvolvimento de uma variedade de micro-organismos (MARSH, 2003).

A cárie dentária é uma doença infecciosa transmissível, considerada um problema de saúde pública (NARVAI, 2000; OLIVEIRA et al., 2008). Dentre os micro-organismos envolvidos neste processo destacam-se as bactérias fermentadoras como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, e *Lactobacillus casei* que atuam sobre os carboidratos introduzidos na dieta alimentar. Acredita-se que os estreptococos estejam envolvidos com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto os lactobacilos sejam os responsáveis pela consolidação da lesão (VAN HOUTE, 1993; OLIVEIRA et al., 2008). A placa bacteriana representa um biofilme verdadeiro, pois consiste de bactérias em matriz composta principalmente de polímeros extracelulares e produtos do exsudato do sulco gengival (LANG et al.,

2005), fornecendo às bactérias proteção, inclusive contra agentes antimicrobianos (LANG et al., 2005; MORAIS et al., 2006).

A microbiota bucal sofre influência de fatores externos como tabagismo, alcoolismo, estado nutricional, higiene bucal, antibioticoterapia e permanência em ambientes hospitalares, que levam a possibilidade de selecionar espécies bacterianas (MISIARA, 2004; MORAIS et al., 2006), com conseqüente surgimento de isolados resistentes.

A doença periodontal causada por espécies como *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus sanguinis* é considerada como resultado de um processo interativo entre o biofilme e os tecidos periodontais por meio de respostas celulares e vasculares (SALLUM et al., 2004). A periodontopatia em alguns casos pode levar o paciente ao óbito pelo fato de ter relações diretas com doenças sistêmicas, como no caso de infecções respiratórias graves (MORAIS et al., 2006).

Diante dos dados encontrados na literatura fica clara a importância pela busca de novas opções terapêuticas para o combate de infecções causadas por diferentes micro-organismos.

1.2.2- Atividade antioxidante

A forma humana que se apresenta hoje teve origem com as sucessivas modificações físico-químicas ocorridas no universo que levaram ao processo de transformação de energia com conseqüente início da incorporação do oxigênio sob forma molecular gasosa. Todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia, exceto os organismos que estão adaptados a viver em

condições de anaerobiose, como por exemplo, alguns micro-organismos (KARLSSON, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou radicais livres são formados durante o processo respiratório e apesar de uma existência breve, possuem certo instante livre, no qual procuram reagir com a matéria circundante, adquirindo assim estabilidade (BRIGANTI e PICARDO, 2003).

A toxicidade ou danos provocados pelas EROs em nível molecular, orgânico e celular levou a um crescente interesse por parte dos pesquisadores durante as últimas décadas devido as evidências de que diversas patologias humanas e até mesmo o processo de envelhecimento possuam relação com a formação destas moléculas (JENKINS e GOLDFARB, 1993; LIMA e ABDALLA, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Substâncias antioxidantes são aquelas que quando presentes retardam ou inibem significativamente a oxidação de substratos. O equilíbrio entre as EROs e agentes antioxidantes é o mecanismo que melhor previne o estresse oxidativo e os danos provenientes dele (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007; WU et al., 2008).

O método de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) consiste na capacidade deste em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H sendo então reduzido. O radical DPPH é instável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Pode ser facilmente detectado por espectrofotometria devido à sua intensa absorção na região visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH e a amostra, em solução. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação é verificada pela

porcentagem de DPPH reduzido restante no sistema. Então a porcentagem de DPPH restante é proporcional a concentração de antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; BONDET et al., 1997; JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2000; MENICHETTI et al., 2005; LIU, 2010).

1.2.3- Avaliação da citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* para a verificação da segurança do uso de produtos obtidos a partir de materiais naturais, especialmente os de origem vegetal, constituem uma etapa importante do processo de obtenção de moléculas farmacologicamente ativas, uma vez que esta avaliação preliminar permite diferenciar dentre as diversas espécies vegetais e dentre os compostos delas obtidos aqueles que realmente trazem benefícios a saúde humana.

A análise comparativa em relação às reações das células *in vitro* e ao extrato ou composto em teste e os benefícios ou malefícios trazidos por eles podem ser observados com sucesso em testes de citotoxicidade (SIMONI et al., 2002; BELLINI et al., 2006; COSTA et al., 2008). Além de estes apresentarem como vantagens a possibilidade de controle das variáveis, o fato da manutenção das culturas serem relativamente mais fácil quando comparadas aos animais em laboratório, permitir que a utilização de animais seja evitada por questões éticas, fácil reprodutibilidade, baixo custo e maior rapidez na obtenção de resultados (SIMONI et al., 2002; ROGERO et al., 2003; BARILE, 2008).

A necessidade de testes com animais, e ainda os níveis de segurança para a realização desses testes, caso sejam considerados convenientes podem ser devidos a

partir dos resultados obtidos nessa fase preliminar de avaliação da toxicidade (SEGNER, 1994; BARILE, 2008).

De acordo com Cruz et al. (2004) existe uma forte tendência, devido a questões éticas relacionadas com o trabalho utilizando animais, de que o número de protocolos para testes *in vitro* e o número de estudos realizados utilizando este tipo de metodologia aumente no futuro, o que vem levando a padronização e validação de vários destes (CARFI et al., 2007).

Técnicas de coloração onde ocorrem geralmente reações de oxidação do corante em contato com células vivas, complementadas dependendo da metodologia empregada, com leituras de fluorescência ou contagem celular são utilizadas para a observação das alterações causadas nas células, onde após exposição da cultura de células de mamíferos a uma determinada substância, observam-se modificações como inibição da formação de colônias celulares, lise celular, descolamento do tecido, morte celular e viabilidade celular, que é um dos testes mais frequentes para a análise da citotoxicidade *in vitro* (CIAPETTI et al., 1996; O'BRIEN et al., 2000; ROGERO et al., 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2- *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae)

A família Equisetaceae pertence às pteridófitas e possui registros fósseis do período jurássico (205.7-142 milhões de anos) (SEHNEM, 1984). O único gênero vivo, ainda encontrado, *Equisetum*, é extremamente variável em sua morfologia (VEIT et al., 1994). Está presente em grande parte do globo apresentando aproximadamente 25 espécies das quais 13 estão na América.

As plantas que representam esta família podem ser terrestres, palustres ou aquáticas. Possuem caule subterrâneo, curto a longo prostrado, livremente ramificado, parte aérea ereta, nós e entrenós bem delimitados e articulados, longitudinalmente estriado, com 0,1 a 8 m de comprimento, frequentemente ramificado em toda extensão e folhas pequenas, localizadas nos nós. Esporângios em esporangióforos condensados em estróbilos terminais e esporos esferoidais, granulados (SEHNEM, 1984).

As *Equisetum* são cosmopolitas, só estando ausentes na Austrália e Antártica, sendo nativas da América do Norte, indo do Alasca até sul da Califórnia, podendo ser encontradas também em toda Europa e nas ilhas Britânicas (MITICH, 1992). No Brasil podem ser encontradas em toda região central (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo). São plantas perenes que se reproduzem por meio de esporos, suas folhas são grossas e fechadas e os talos são ocos, articulados, e tem cumes. São plantas que gostam de locais úmidos e terra rica em matéria orgânica, são muito rústicas e tolerantes ao frio, uma das poucas pteridófitas que se aclimatam ao sol pleno (MITICH, 1992).

Espécies do gênero mostraram em estudos prévios a existência de compostos como flavonóides, esteróis, terpenos, saponinas, ácidos fenólicos e sílica com

atividades biológicas relacionadas (SYRCHINA et al., 1980; VEIT et al., 1995; GURBUZA et al., 2009). No oleoresina foi observado a presença de fitoesteróides e hidrocarbonetos (MICHIELIN et al., 2005; DANIELSKI et al., 2007; CHÉRIGO et al., 2008).

Estudos realizados com *Equisetum arvense* mostraram que esta espécie possui atividade antioxidante, antimicrobiana, genotóxica (MILOVANOVIĆ et al., 2007), antinociceptiva e anti-inflamatória (DO MONTE et al., 2004). Recentemente esta espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) que traz uma lista de plantas medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (RENISUS, 2009). Devido a este fato e aos relatos de atividades relacionados a esta espécie, foi proposto que também a espécie *E. hyemale* poderia possuir propriedades biológicas tais como: antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, sendo portanto escolhida baseando-se na quimiotaxonomia (PARK e JEON, 2008).

Em estudo realizado por Zaroni et al. (2004) com o intuito de realizar o controle de qualidade microbiológico de espécies vegetais da região central do estado do Paraná, observou-se que uma espécime do gênero *Equisetum*, apresentou na análise microbiológica $8,0 \times 10^5$ UFC/g de aeróbios totais e $2,0 \times 10^6$ UFC/g de bolores e leveduras, com presença de enterobactérias e de *Pseudomonas aeruginosa*.

A espécie *Equisetum hyemale* também conhecida popularmente como cavalinha (Figura 1), apresenta o subgênero *Hippochaete hyemalis* e pertence à classe *Articulatae*, ordem *Equisetales*. É considerada uma planta medicinal (MAIOLI-AZEVEDO e FONSECA-KRUEL, 2006), usada geralmente, para combater doenças

infeciosas renais ou do trato urinário sob a forma de chás (CANALES et al., 2005). Na medicina oriental vem sendo utilizada em terapias relacionadas a inflamações nos olhos (PARK e JEON, 2008).

Foram identificados em seu óleo essencial ésteres de ácidos graxos dentre eles o palmitato de etila (SUI et al., 1997), além disso foi descrita a presença de canferol no extrato etanólico (SUI et al., 1996) e foi ainda observada a presença de glicosídeos de flavonóides (GEIGER, REICHERT, MARKHAM, 1982).

Estudos demonstraram algumas atividades biológicas relacionadas ao *E. hyemale* como: antihiperlipidêmica, antimicrobiana, hepatoprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (XU et al., 1993; NAVARRO et al., 1996; ROY-BURMAN et al., 2007; YI et al., 2008; EUN-YUNG e HOON, 2008; PARK e JEON, 2008; PAN et al., 2009).



Figura 1: *Equisetum hyemale*
Fonte: arquivo próprio.

3. OBJETIVO

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico, avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extratos de *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae).

Para tanto, foram necessários os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização físico-química da droga vegetal;
- Investigação da qualidade microbiológica da droga vegetal;
- Caracterização das classes dos principais metabólitos secundários na droga vegetal;
- Obtenção de derivados vegetais de *E. hyemale*: extrato etanólico 70%, extrato metanólico e óleo essencial.
- Estudo fitoquímico preliminar dos extratos de *E. hyemale* utilizando de técnicas de cromatografia;
- Determinação da atividade antibacteriana dos extratos.
- Determinação da atividade antifúngica dos extratos.
- Determinação do potencial antioxidante dos extratos.
- Avaliação da citotoxicidade dos extratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1- Solventes, reagentes e meios de cultura

- 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) – Vetec
- acetato de chumbo – Reagen
- acetato de etila – Labsynth
- acetona – Labsynth
- ácido ascórbico (Vitamina C) – Vetec
- ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) – Acros Organics
- ácido acético glacial – Labsynth
- ácido bórico– Labsynth
- ácido clorídrico– Labsynth
- ácido clorogênico– Vetec
- ácido difenilbórico do éster β - etilamino– Sigma-Aldrich
- ácido fórmico– Labsynth
- ácido gálico – Vetec
- ácido tânico – Vetec
- ácido oxálico– Labsynth
- ácido sulfúrico– Labsynth
- ágar bismuto sulfito– Acumedia
- ágar brain heart infusion – Biobrás
- ágar cetrimida – Acumedia
- ágar eosina-azul de metileno – Difco
- ágar MacConkey – Acumedia
- ágar Müeller- Hinton - Acumedia

- ágar Sabouraud - Acumedia
- ágar tioglicolato- Difco
- ágar tríplice açúcar - ferro - Difco
- ágar verde brilhante - Difco
- ágar Vogel Johnson - Oxoid
- ágar xilose-lisina-desoxicolato - Difco
- água destilada
- água purificada tipo I
- ampicilina - Medley genéricos, comprimidos de 500 mg de ampicilina
- anfotericina B de *Streptomyces* - Sigma-Aldrich
- anidrido acético - Labsynth
- *p*-anisaldeído - Carlo Erba
- azul de metileno - Labsynth
- bicarbonato de sódio - Merck
- *n*-butanol - Labsynth
- caldo lactosado- Difco
- caldo selenito cistina - Acumedia
- caldo soja caseína- Difco
- caldo tetrionato - Acumedia
- caldo triptona de soja - Difco
- canferol- Vetec
- carbonato de sódio - Vetec
- cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio - Merck
- cloreto de alumínio - Reagen

- cloreto de sódio - Labsynth
- cloreto férrico - Reagen
- clorofórmio - Labsynth
- dimetilsulfóxido - Labsynth
- dodecil sulfato de sódio - J. T. Baker
- etanol - Labsynth
- éter de petróleo - Labsynth
- éter etílico - Labsynth
- etilmetilcetona - Labsynth
- fosfato dibásico de sódio - Labsynth
- fosfato monobásico de sódio - Labsynth
- *D*-glicose anidra - Labsynth
- hexano - Labsynth
- hidróxido de amônio - Labsynth
- hidróxido de potássio - Merck
- hidróxido de sódio - Labsynth
- magnésio metálico - Reagen
- metanol - Labsynth
- meio de Eagle - Sigma-Aldrich
- meio Leibovitz - Himedia
- meio RPMI-1640 - Sigma-Aldrich
- polietilenoglicol - Fluka
- *n*-propanol - Labsynth

- quercetina – Vetec
- reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand
- resazurina – Sigma-Aldrich
- rutina – Vetec
- saponina– Serva Electrophoresis
- sangue de coelho- Biotério UNESP
- solução de tripsina-EDTA – Sigma Aldrich
- soro bovino fetal – Gibco
- sulfato de sódio anidro – Labsynth
- vanilina – Synth
- violeta genciana - Reagen
- zinco metálico – Reagen

4.1.2- Equipamentos

- agitador de tubos – Vision KMC 1300V
- aparelho de Clevenger modificado
- autoclave vertical – Fabbe 103
- balança analítica – Micronal AB 204
- balança com infravermelho – Mettler LP12
- balança semi-analítica – Owa Labor
- banho-maria– Fanem 1100
- bico de Bunsen
- bomba de vácuo – Primatec 141
- câmara de fluxo laminar – Veco

- câmara de Neubauer - Boeco
- câmara de ultravioleta 254 nm UV - Prodicil
- contador de colônias- Phoenix
- dessecador de vidro 250 mm- Sp labor
- espectrofotômetro UV- Shimadzu 1603
- estufa de ar circulante- Fanem 320 SE
- estufa de incubação bacteriológica- Fanem 315 SE
- estufa de incubação de CO₂ - Thermo Electron Corporation Forma Series II
Hepa Class 100
- evaporador rotatório - Marconi TE 120
- garrafas para cultura celular - TPP
- lâmina de microscópio
- leitor de fluorescência- Tecan Spectra Fluor Plus acoplado ao programa
Magellin
- liofilizador- Solab
- microfiltro 0,22 µm- Millipore
- micropipetas e multicanais com volume ajustável de 5 a 50 µL, 40 a 200 µL, 200
a 1000 µL- High tech lab
- microscópio óptico- Carl Zeiss Jena
- moinho de bolas - Maneso & Ranieri
- mufla- Forlabo 2764
- paquímetro digital - Dass
- parafilme e filme de PVC- American National

- peagômetro- Phtek PHS 3B
- placa de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck
- placas de 96-wells – TPP 92096 e Costar
- placa de aquecimento – Fistom
- ponteiros descartáveis para volume de 5 a 200 µL e 200 a 1000 µL
- sistema de purificação de água Milli Q – Millipore
- templates de aço (peça única) com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro interno
- tubos plástico cônicos tipo Falcon
- vidrarias em geral

4.2- Métodos

4.2.1- Coleta do material vegetal

O material de *E. hyemale* foi coletado no mês de março de 2009, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas de Araraquara (coordenadas S 21°48'51.4", W 048°12'05.1", altitude 661m). Em seguida passou pelo processo de prensagem, as prensas foram colocadas dentro de estufa a temperatura de aproximadamente 60 °C e ali permaneceram até que o material estivesse completamente seco, cerca de 10 dias.

Para a montagem do material seco utilizou-se a amostra coletada mais representativa e completa. O material, acompanhado de suas descrições essenciais (procedência ou local de coleta, data de coleta, nome do coletor, observações sobre a planta e informações gerais), foi enviado ao Herbário Rioclarense do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro-SP, para identificação, que foi realizada pelo Prof. Dr. Marco Antônio de Assis e está depositada sob o número HRCB 51.670.

4.2.2- Obtenção da droga vegetal

As partes aéreas de *E. hyemale* foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C até massa constante e pulverizadas em moinho de bolas.

4.2.3- Análises físico-químicas da droga vegetal

4.2.3.1- Determinação do pH

Foram preparadas três soluções aquosas a 1% com a droga de *E. hyemale*. Em erlenmeyer, 99,00 g de água foram colocados sobre uma chapa-elétrica para ebulição durante 5 minutos. Em seguida, a água foi vertida sobre 1,00 g das drogas, o recipiente foi fechado e deixado em infusão por 15 minutos.

Após este tempo, as misturas foram filtradas e depois de esfriarem, foi feita a leitura do pH em peagômetro calibrado. Determinou-se também o pH da água destilada utilizada nos testes. Os resultados equivalem à média de três determinações.

4.2.3.2- Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado segundo Vigo et al. (2004), com modificações, utilizando-se o método de perda por dessecação em balança com infravermelho. Neste método, 4,00 g da droga foram pesados na balança com infravermelho e submetidos à temperatura de 110 °C pelo período de aproximadamente uma hora. Após este período, foi feita a leitura do peso, a qual foi repetida a cada hora até que o peso das amostras não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (%; p/p) e equivalem à média de três determinações.

4.2.3.3- Determinação da perda por secagem

Foram pesadas 50,00 g das droga vegetal fresca em triplicata e colocou-se em temperatura ambiente com ausência de luminosidade. Colocou-se também a mesma quantidade da droga em triplicata em estufa com circulação de ar a 40 °C. De ambas as drogas, alíquotas foram pesadas diariamente até massa constante. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

4.2.3.4- Determinação do teor de extrativos

Pesou-se 1,00 g da droga de *E. hyemale* que foi submetido à decocção com 100,00 g de água destilada durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL, a mistura foi filtrada e os primeiros 20 mL foram desprezados. Do restante, foram pesados 20 g, sendo evaporados em banho de aquecimento até secura, colocados em estufa a 110 °C por 1 h, resfriados em dessecador até peso constante.

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações, relativa à massa inicial de amostra.

4.2.3.5- Determinação do teor de cinzas totais

Este teste foi realizado segundo a Farmacopéia (1988) com modificações. Cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 450 °C por 30 minutos, resfriados e as respectivas massas foram determinadas em balança analítica. Aos cadinhos foi adicionada uma amostra de 3,00 g da droga que foi então incinerada primeiramente e submetida na sequencia à calcinação em mufla a 450 °C por 4 h. Após arrefecimento em dessecador, determinaram-se os valores de massa constante.

Os valores foram expressos em porcentagem de peso de cinzas na droga (%; p/p) e equivalem à média de três determinações.

4.2.4- Análises microbiológicas

4.2.4.1- Contagem do número total de micro-organismos

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos micro-organismos totais. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL da amostra 1:10 e adicionados 20,0 mL de ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para fungos, a 47 °C em placa de Petri. Após solidificação do meio foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) (USP, 2003; PINTO et al., 2003).

4.2.4.2- Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* sp e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para 2 tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetrionato para 1 tubo contendo ágar verde brilhante e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. Foi realizado da mesma forma com a

amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram. Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina-azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi realizada através de método de Gram (USP, 2003; PINTO et al., 2003).

4.2.4.3- Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, uma alçada foi semeada em placas de ágar Vogel Johnson e ágar cetrimida, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada pelo método de coloração de Gram (USP, 2003; PINTO et al., 2003).

4.2.5- Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários

A triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários da droga vegetal de *E. hyemale* foi realizada segundo as metodologias estabelecidas por Costa (1994), Souza et al. (2003) e Simões et al. (2004).

4.2.5.1- Pesquisa de Alcalóides

Foram colocados 5,00 g da droga de *E. hyemale* em gral de porcelana, alcalinizando-se com solução de carbonato de sódio a 10% e, posteriormente, adicionaram-se 25 mL de clorofórmio. A mistura foi transferida para funil de separação com auxílio de papel de filtro previamente embebido em clorofórmio, agitando-se com 7 mL de ácido clorídrico 2%. A camada ácida foi separada e utilizada para as reações de caracterização com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand. Como resultado positivo consideraram-se as precipitações visualizadas sobre fundo escuro.

4.2.5.2- Pesquisa de Antraquinonas

4.2.5.2.1- Antraquinonas livres

Foi agitado 1,00 g da droga de *E. hyemale* com 10 mL de éter etílico, filtrando-se posteriormente. À solução etérea, foi adicionado 1 mL de amônia diluída, sob agitação. Como resultado positivo considerou-se uma coloração rósea na fase aquosa.

4.2.5.2.2- Antraquinonas heterosídicas

À 1,00 g de droga foram adicionados 20 mL de água, fervendo-se por 5 minutos. A mistura foi resfriada e filtrada, juntando-se 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30% ao filtrado; após a fervura em chapa por 5 minutos, procedeu-se a esfriamento e filtração, sendo feitas duas extrações com 5 mL de éter etílico. Foram unidas as fases etéreas agitando-se com 3 mL de amônia diluída. Para resultado positivo, a camada aquosa deve tornar-se rósea.

4.2.5.3- Pesquisa de Flavonóides

Trataram-se 3,00 g da droga de *E. hyemale* com 20 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho a 60 °C. Depois de filtrado e seco, foram adicionados 20 mL de metanol à droga, aquecendo-se novamente em banho de aquecimento, com posterior filtração e evaporação até *secura*. Ao final, o resíduo foi recuperado com 10 mL de etanol.

4.2.5.3.1- Reação de Shinoda

Foram colocados 1 mL do extrato obtido em 4.2.5.3 em tubo de ensaio e foi adicionado um fragmento de magnésio metálico e gotas de ácido clorídrico concentrado. Após o desprendimento de H₂ nascente, há o aparecimento da coloração rósea ou vermelha. Esta reação identifica a presença de flavonóides das classes flavonas, flavonóis ou flavononas.

4.2.5.3.2- Reação de Taubock

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato até *secura*, após esfriar, umedeceu-se o resíduo com algumas gotas de acetona. Foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Foram evaporados, em banho de aquecimento, novamente, até a *secura* evitando aquecimento prolongado. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura foi observada sob luz ultravioleta (254 nm). Em caso positivo, ocorre aparecimento de fluorescência amarelo esverdeada, verificando-se a presença de flavonóides da classe dos flavonóis.

4.2.5.3.3- Reação de Pew

Foram evaporados, em banho de aquecimento, 3 mL do extrato em tubo de ensaio até a secura; ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Foram colocadas algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. Deve aparecer coloração vermelha, verificando-se a presença de flavonóides da classe das flavonas, flavonóis e flavononas.

4.2.5.3.4- Reação do cloreto férrico

Foram adicionadas, a 1 mL do extrato, algumas gotas de cloreto férrico a 2%. Deve aparecer coloração verde (flavonas) ou amarelo (chalconas) ou ainda violáceo (flavonóis, flavononas), dependendo do flavonóide presente.

4.2.5.3.5- Reação do cloreto de alumínio

Foram umedecidas áreas diferentes de papel de filtro com o extrato. Foi colocada sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. Deve-se observar sob luz ultravioleta a intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada (flavonas) ou amarela (flavonóis, flavononas,) ou azul-esverdeado (chalconas) ou amarelo-acastanhado (isoflavonas), dependendo do flavonóide presente.

4.2.5.4- Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos

Foram adicionados a 5,00 g da droga de *E. hyemale* 50 mL da solução etanol:água 70% e esta foi submetida a aquecimento em banho de aquecimento por 10 minutos, completando o volume para 30 mL após resfriamento. Ao filtrado, foram

adicionados 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10%. Após agitação e repouso, a mistura foi filtrada e foi adicionado 10 mL de fosfato ácido de sódio a 10%, agitando bem para filtrar. O filtrado foi colocado em um funil de separação para fazer duas extrações com 15 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram unidas, tratando com sulfato de sódio anidrido e evaporando até a metade do volume.

4.2.5.4.1- Reação de Legal

Esta reação permite verificar a presença de glicosídeos com o anel lactônico insaturado. Evaporou-se 2 mL do extrato clorofórmio e dissolveu-se o resíduo em 1 mL de piridina onde foi adicionado 0,5 mL de NaOH 10% e 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 10%. Em caso positivo, observa-se uma coloração vermelha intensa vinhosa.

4.2.5.4.2- Reação de Kedde

Esta reação permite verificar a presença de glicosídeos com o anel lactônico insaturado. Após evaporação de 2 mL do extrato clorofórmio, dissolveu-se o resíduo com 0,5 mL do reagente de Kedde (ácido 3-5 dinitrobenzóico 1% em MeOH), adicionou-se 1 mL de uma mistura de NaOH 10% em MeOH 1:1 preparada pouco antes do uso. Deve aparecer uma coloração vermelha violácea até castanho.

4.2.5.4.3- Reação de Pesez

Esta reação permite verificar a presença de glicosídeos com os desoxiaçúcares. Foram evaporados 2 mL do extrato clorofórmio e adicionou-se ao resíduo 1 mL do reagente de Pesez A (xantidrol 0,5% em MeOH) e aqueceu-se a 100 °C por 3 minutos. Após esfriar, colocou-se o reagente de Pesez B (ácido clorídrico a

2% em ácido acético). Ferveu-se novamente. Deve se observar, em caso positivo, o aparecimento de coloração vermelha.

4.2.5.4.4- Reação de Keller- Killiani

Esta reação permite verificar a presença de glicosídeos com os desoxiaçúcares. Evaporou-se 2 mL do extrato clorofórmio, tratou-se o resíduo com 1 mL de ácido acético, adicionou-se gotas de cloreto férrico a 2% e transferiu-se o conteúdo para outro tubo contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em caso positivo, deve aparecer na zona de contato um anel castanho avermelhado e a camada acética deve tomar coloração verde- azulada.

4.2.5.4.5- Reação de Liebermann-Burchard

Esta reação permite verificar a presença de glicosídeos com o núcleo esteroidal. Foram evaporados 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Ao resíduo foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Deve aparecer coloração castanha.

4.2.5.5- Pesquisa de Saponinas

Foram fervidos 2 g da droga de *E. hyemale* com 10 mL de água destilada durante 3 minutos, filtrando através de algodão para um tubo de ensaio, o qual foi agitado vertical e vigorosamente durante 20 segundos. Após repouso de 20 minutos, ainda deve existir espuma no tubo e esta não deve desaparecer com a adição de 1 mL de HCl 2 N.

4.2.5.6- Pesquisa de Taninos

Foram preparados decoctos com 5 g da droga de *E. hyemale* em 100 mL de água destilada.

4.2.5.6.1- Reação da gelatina

A 2 mL da solução extrativa foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado demonstra reação positiva para taninos.

4.2.5.6.2-Reação com sais de ferro

A 2 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de água destilada e 2-4 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

4.2.5.6.3- Reação com acetato de chumbo

A 5 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.2.6- Obtenção de derivados vegetais de *E. hyemale*

A droga vegetal obtida por pulverização foi submetida ao processo de extração com etanol 70% (EtOH 70%) e com metanol (MeOH) por percolação exaustiva segundo List e Schmidt (1989). Cada percolação foi realizada com cerca de

80 g da droga vegetal e o ponto de parada se deu quando o percolato apresentou-se sem cor e odor observados no início do processo.

Todos os extratos assim obtidos foram evaporados em evaporador rotatório. Em seguida o fim da secagem do extrato metanólico foi realizado a temperatura ambiente sob fluxo de ar em vidro de relógio, enquanto que o extrato etanólico foi liofilizado. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

Para obtenção de óleo essencial bruto, cerca de 2 L de água destilada foi acrescentada a 100,00 g de *E. hyemale* fresca e picotada, realizando-se o processo de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger modificado (WASICKY, 1963).

4.2.7- Análises fitoquímicas dos extratos

4.2.7.1- Perfil cromatográfico dos extratos de *E. hyemale* em CCD

A partir dos resultados obtidos nas reações preliminares de caracterização dos metabólitos secundários fez-se uma otimização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) comparativa com uma série de sistemas eluentes e reveladores, preparados segundo Wagner et al. (1984), utilizando-se padrões de acordo com os metabólitos observados nas reações preliminares. Utilizou-se como padrão a quercetina, canferol, rutina, ácido clorogênico e um padrão para saponinas, adquirido da empresa Serva Electrophoresis (nº cat. 34655.02). As amostras dos extratos foram preparadas a 0,5%.

- Sistemas eluentes e respectivos reveladores testados:

1º) Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27, v/v/v/v)

Revelador: *Natural Products/Polyethylene Glicol* (NP/PEG) e anisaldeído.

2º) Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:etilmetil cetona:água (50:7:3:30:10, v/v/v/v/v)

Revelador: NP/PEG

3º) *n*-butanol:ácido acético glacial:água (40:10:50, v/v/v)

Revelador: NP/PEG

4º) Clorofórmio:acetona:ácido fórmico (75:16,5:8,5, v/v/v)

Revelador: NP/PEG

5º) Clorofórmio:acetato de etila (60:40, v/v)

Revelador: NP/PEG

6º) Clorofórmio:metanol:água (65:50:10, v/v/v)

Revelador: vanilina sulfúrica

4.2.7.2- Espectrofotometria na região de ultravioleta

Foram pesados, exatamente, 10,00 mg de ácido gálico, de ácido tânico e de cada extrato, em seguida foram dissolvidos em 1 mL de água:metanol (1:1; v/v) e diluídos 1:1000 em metanol. A concentração final das soluções de leitura das substâncias padrão e dos extratos foi de 0,01 mg/mL. A leitura de absorvância foi realizada em faixa de 190 a 400 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Shimadzu-1603 com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram lidas frente a branco de metanol (CHOI et al., 2006).

4.2.8- Teste de hemólise

Com a finalidade de se verificar a presença de saponinas nos extratos de *E. hyemale* realizou-se o teste de hemólise segundo Yoon e Wrolstad (1984), com modificações.

Os extratos foram pesados com o auxílio de uma balança analítica digital e diluídos em dimetilsufóxido (DMSO) nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. O DMSO foi utilizado para as diluições por ser considerado o melhor solvente, pois além de solubilizar adequadamente os extratos é pouco volátil, o que não permite a precipitação da amostra.

Preparou-se o ágar Mueller Hinton (MH) acrescido com 5% de sangue de coelho desfibrinado. Após solidificação, foram realizados sete orifícios de 5 mm de diâmetro. Em três orifício foram acrescentados 50 µL do extrato etanólico 70% e em outros três orifícios foram acrescentados 50 µL do extrato metanólico, ambos nas três concentrações definidas. No orifício central realizou-se o controle positivo com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, esse padrão foi utilizado devido a sua reconhecida capacidade de lise celular. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 h e a atividade hemolítica foi determinada pela medida dos halos formados. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.9- Determinação da atividade antimicrobiana

4.2.9.1- Método de difusão em ágar

4.2.9.1.1- Linhagens de micro-organismos

Foram utilizados para o método de difusão em ágar micro-organismos fornecidos pelo "American Type Culture Collection": *Staphylococcus aureus* (ATCC

25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 9392) e *Candida albicans* (ATCC 64548). Estas amostras estão mantidas em coleção no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica- BIOTECFAR, em freezer à -20°C.

4.2.9.1.2- Diluição dos extratos de *E. hyemale*

Após serem pesados 5 mg com o auxílio de uma balança analítica digital, os extratos foram diluídos em 500 µL de DMSO. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:1 em solução salina previamente esterilizada (0,9%), portanto a concentração final dos extratos foi de 5 mg/mL.

4.2.9.1.3- Preparo do inóculo

Inicialmente preparou-se a escala de 0,5 de McFarland. Para isso foram adicionados 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 ml de ácido sulfúrico a 1%. Em seguida transferiu-se 2 mL dessa suspensão para uma cubeta espectrofotométrica.

Para calibrar a absorvância a 100% em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 ou 625 nm (leveduras ou bactérias), foi utilizada água destilada. Em seguida colocou-se a suspensão do tubo 0,5 de McFarland, esperando-se obter uma absorvância de 0,08 a 0,1. Estas suspensões foram utilizadas para padronização da suspensão de *Candida* e bactérias em número de células por mL.

Para *Candida albicans* cinco colônias com diâmetro de cerca de 1 mm, de cultura de 24 h a 35 °C, foram suspensas em 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão foi agitada em vórtex por 15 segundos e ajustada para obtenção de suspensão de turvação na escala 0,5 de McFarland, relativa a 1.10^6 a 5.10^6 leveduras/mL em solução salina, com auxílio de contagem do número de células em

câmara de Neubauer.

4.2.9.1.4- Preparo dos controles

O antibiótico ampicilina foi utilizado como substância controle, uma vez que as cepas bacterianas utilizadas são sensíveis à sua ação. Procedeu-se a dissolução de 500 mg de ampicilina em 1000 mL de água destilada diluindo 1:10 em solução salina estéril, de forma que a concentração desta solução de estoque fosse de 50 µg/mL.

Anfotericina B foi o antifúngico usado como controle para a cepa de *Candida albicans*. Dissolveu-se 16 mg de anfotericina B em 10 mL de DMSO para o teste foram feitas duas diluições 1:5 (v/v) em meio de cultura de forma que a concentração final foi de 64 µg/mL.

4.2.9.1.5.- Técnica com “templates”

O método de difusão em ágar com “templates” foi realizado baseado nas Normas M2-A9 e M44-A2 do *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, com modificações descritas a seguir (CLSI, 2006; CLSI, 2009).

As suspensões bacterianas preparadas anteriormente foram diluídas 1:100 com base na quantidade de ágar Mueller Hinton colocado nas placas, sendo que a concentração final foi de 10^6 células/mL.

Para o método de difusão em ágar com a *Candida albicans*, foram aplicados 100 µL da suspensão preparada anteriormente sobre o meio de cultura sólido na placa, dispersando com alça de Drigalsky. Sobre estes meios, foram adicionados 100 µL das amostras dos extratos de *Equisetum hyemale* utilizando “templates” com 6

orifícios de 6 mm de diâmetro interno.

Antes da incubação a 37°C por 24 h para as bactérias e 35°C por 48 h para a *Candida albicans*, as placas foram deixadas duas horas a temperatura de 4 °C para permitir a difusão das amostras (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Foram realizados também controle do DMSO (1:1) e da solução salina. Após a incubação, o diâmetro do halo de inibição, medido com auxílio de paquímetro, foi considerado como a capacidade de inibição da amostra contra o micro-organismo testado. Os testes foram feitos em triplicata.

4.2.9.2- Método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.2.9.2.1- Linhagens de micro-organismos

Foram utilizados para este teste micro-organismos fornecidos pelo “American Type Culture Collection”: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 9392), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 23212), *Candida albicans* (ATCC 64548). Estas amostras estão mantidas em coleção no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica- BIOTECFAR, em freezer à -20°C.

Foram utilizados também micro-organismos bucais: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49452), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578) mantidos no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca, em freezer à -20 °C.

Além destes micro-organismos foram utilizados os seguintes fungos dermatófitos, isolados clínicos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, cedidos pela Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida do laboratório de Micologia da UNESP Araraquara.

4.2.9.2.2- Diluição dos extratos de *E. hyemale*

Após serem pesados com o auxílio de uma balança analítica digital, os extratos foram diluídos em DMSO em uma concentração de 50 mg/mL. Em seguida, foram acrescidos a 100 µL dessa solução, 900 µL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) no caso das bactérias ou caldo RPMI-1640 no caso dos fungos. Os extratos foram avaliados nas concentrações entre 1250-1,20 µg/mL.

Para os micro-organismos bucais os extratos foram avaliados nas concentrações entre 2000-0,976 µg/mL

4.2.9.2.3- Preparo do inóculo

Para os testes com bactérias e micro-organismos bucais preparou-se a escala de 0,5 de McFarland como descrito no teste anterior e desta realizou-se uma diluição 1:300 em caldo BHI e TSB (Tryptona de Soja) respectivamente, sendo que a concentração final foi de $2,5 \cdot 10^5$ células/ mL.

Os experimentos usando leveduras foram realizados ajustando a suspensão do tubo que corresponde à escala 0,5 de McFarland, assim como no teste anterior porém a suspensão foi novamente diluída para ser utilizada no ensaio a concentração de $5 \cdot 10^2$ a $2,5 \cdot 10^3$ leveduras/mL.

Nos experimentos para fungo dermatófitos utilizou-se a concentração de

5.10³ células/mL em meio RPMI- 1640 com contagem realizada em câmara de Neubauer.

4.2.9.2.4- Preparo dos controles

Para os testes com bactérias e fungos utilizou-se os mesmos antibióticos do teste anterior. A ampicilina foi diluída a partir da solução-mãe de 500 mg/L, na proporção 1:10 (m/v) em BHI, sendo que sua faixa de concentração variou de 12,5 µg/mL a 0,01 µg/mL. A solução estoque de anfotericina B foi diluída duas vezes na proporção 1:5 (v/v) em RPMI-1640 para a *C. albicans* e para os fungos dermatófitos, sendo que sua faixa de concentração variou de 16 µg/mL a 0,01 µg/mL.

Para os testes com micro-organismos bucais utilizou-se como controle o dicloridrato de clorexidina, primeiro pesou-se 1 mg da droga que foi dissolvida na proporção 1:10 (m/v) em água destilada esterilizada e em seguida foi diluído 1:5 (v/v) em caldo TSB, chegando a uma concentração de 20 µg/mL, sendo que sua faixa de concentração variou de 5,9 a 0,0115 µg/mL.

Também foram realizados os controles de esterilidade dos meios de cultura utilizados, dos inóculos (que deve apresentar crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), controle de esterilidade dos extratos de *E. hyemale* e controle do solvente (DMSO) a partir da diluição 1:5 (v/v) em meio de cultura.

4.2.9.2.5- Técnica de microdiluição em caldo

O ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a bactérias, micro-organismos bucais, levedura do gênero *Candida* e fungos dermatófitos foram realizados utilizando-se a técnica de diluição em microplaca,

respectivamente segundo as Normas M7-A7; M7-A6; M27-A3/S3 e M38-A do *National Committee For Clinical Laboratory Standards*, atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2002, 2003; CLSI, 2006; CLSI, 2008).

Realizou-se o método de determinação da CIM por diluição em microplacas de 96 orifícios onde foram depositados um total de 100 μL da mistura do caldo BHI para bactérias ou TSB para micro-organismos bucais ou RPMI-1640 (tamponado em MOPS pH 7,0) para *Candida albicans* e RPMI-1640 (com 2% de glicose tamponado em MOPS pH 7,0) para os fungos dermatófitos.

Em seguida acrescentou-se 100 μL das soluções dos compostos e realizou-se diluições seriadas de 100 μL . Após diluição foram acrescentados 100 μL das suspensões dos micro-organismos relacionados.

Para a CIM frente aos fungos dermatófitos testados foram depositados em uma das colunas 100 μL do meio e 100 μL do extrato a ser testado, servindo de controle negativo do extrato e também para controle de turbidez. Na coluna 12 realizou-se controle do meio, para comparação visual da turbidez.

Para as bactérias e micro-organismos bucais as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h e para as leveduras foram incubadas a 35°C por 48 h sob agitação constante a 150 rpm.

Seguido o período de incubação para análise dos resultados do crescimento bacteriano e de micro-organismos bucais, foram adicionados em cada orifício, 15 μL de solução de resazurina a 0,01% em solução aquosa estéril. Com este sistema revelador observa-se após algumas horas (aproximadamente 2 horas), a presença da

cor azul representando ausência de crescimento e de cor rosa como presença de crescimento (GABRIELSON et al., 2002).

Para a observação das leveduras foram adicionados em cada orifício, 20 μ L de solução aquosa a 2% de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) após incubação a 35°C por cerca de 3 h, a coloração vermelha representa presença de crescimento (ELOFF, 1998).

No caso dos fungos filamentosos, a placa foi incubada em estufa a 28°C sob agitação constante de 100 rpm por sete dias. Após este período foi observado o desenvolvimento do micro-organismo em relação aos controles negativos, isto é, ausência de crescimento.

Foi determinada como CIM a menor concentração do extrato onde não ocorreu o desenvolvimento dos micro-organismos. Os testes foram realizados em triplicata e estão representados na Figura 2.

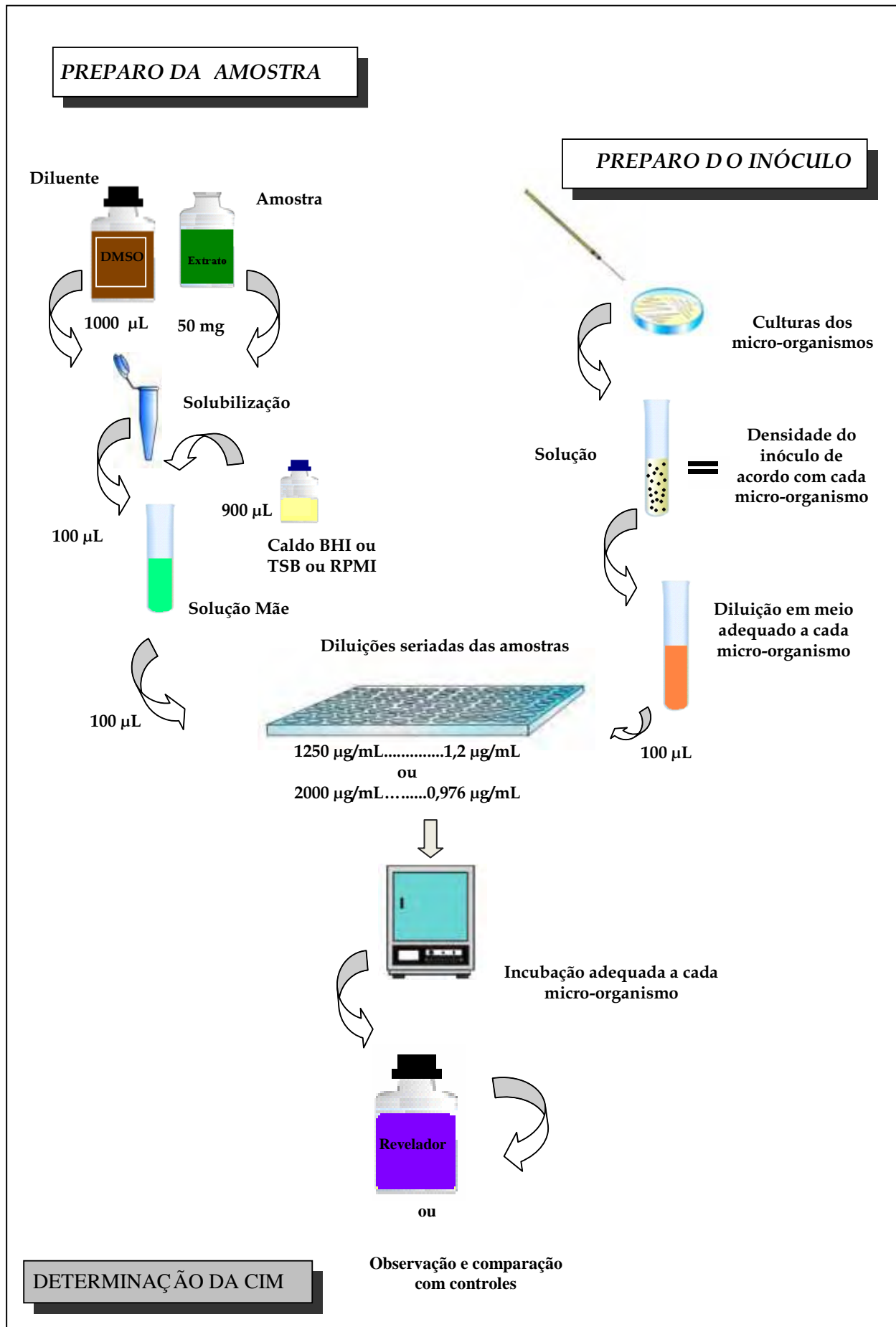


Figura 2- Esquemática do preparo dos extratos e dos inóculos para a determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM.

4.2.9.2.6- Método de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para a determinação destas concentrações empregaram-se as séries utilizadas para a determinação da CIM. Após o período de incubação e antes de realizar a revelação com os respectivos reveladores já citados, com o auxílio de uma pipeta multicanal plaqueou-se cada poço da microplaca. Foram utilizados o meio BHI ágar para as bactérias e Sabouraud ágar para a *Candida albicans* e para os fungos dermatófitos em placa de Petri de 12 mm de diâmetro, determinando assim respectivamente o valor da concentração bactericida e fungicida mínima. As placas de Petri foram incubadas nas condições apropriadas para cada micro-organismo. As concentrações foram então observadas pela ausência ou presença de crescimento dos micro-organismos (HAWSER e ISLAM, 1999; HÖRNER et al., 2008).

4.2.10- Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres

O potencial de atividade antioxidante dos extratos foi determinado baseando-se na atividade sequestrante do radical de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) de acordo com Liu (2010) com modificações.

Os testes foram feitos com o extrato etanólico 70% e metanólico obtidos de *E. hyemale* nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, em metanol. Como controle positivo utilizou-se o ácido ascórbico (vitamina C) por sua reconhecida atividade antioxidante, nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, em metanol.

A 1 mL das soluções de amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de DPPH 0,004% em metanol. As soluções foram agitadas em vórtex e mantidas no

escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita posteriormente a este período, a 517 nm, em espectrofotômetro, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A solução utilizada como branco consistiu em 1 mL da solução de metanol. Foi utilizada solução de 1 mL de metanol e 2,5 mL de solução de DPPH como controle negativo.

A atividade anti-radicalar foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação:

$$\% = 100 \cdot \frac{Aa - Ad}{Ad}$$

onde:

Aa = absorvância da amostra;

Ad = absorvância da solução de DPPH (controle negativo).

Os testes foram realizados em triplicatas e realizou-se ainda análise estatística por ANOVA (Análise de Variância) com $p < 0,05$, aplicando-se o teste de Tukey.

4.2.11- Avaliação da citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade foram utilizados dois tipos células: fibroblatos da córnea de coelho (linhagem SIRC ATCC CCL-60) e macrófagos (linhagem J774).

As células de fibroblastos, foram mantidas em garrafas de cultura em meio Eagle (pH 7,0) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, preparado com 10% de soro bovino fetal e 0,2% de bicarbonato de sódio.

As células de macrófagos, foram mantidas em garrafas de cultura em meio RPMI-1640 (pH 7,0), preparado com 10% de soro bovino fetal, 0,2% de bicarbonato

de sódio e 10 mM de Hepes, ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de solução de anfotericina B.

Os dois tipos celulares foram incubados sob as mesmas condições, em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.11.1- Preparo das amostras

Foram pesados 20 mg dos extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* e dissolvidos em 200 µL de DMSO, em seguida, foram diluídos 1:5 com meio de cultura e 20 µL foram aplicados em 180 µL de meio e diluídos de forma seriada na proporção 1:1. A faixa de concentração do teste variou de 2000 µg/mL a 15,65 µg/mL para ambos os extratos e os testes foram realizados em triplicata.

4.2.11.2- Procedimento

A técnica consistiu em coletar as células, por tripsinização (solução tripsina 0,25%-EDTA 0,53 mM) ou com o auxílio de “scraper”, para fibroblastos e macrófagos, respectivamente e centrifugá-las a 1500 rpm por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de 10⁵ células/mL em meio de cultura.

As células foram incubadas em microplacas de 96 poços, a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h para os macrófagos e 72 h para os fibroblastos. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção.

Em outra microplaca de 96 poços foram colocados 100 µL de meio em todos os poços, exceto nos poços da coluna 1, onde foram acrescentados 180 µL de meio de

cultura e 20 μL das amostras previamente diluídas 1:5 dos extratos, foi então realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) a partir destes poços com 200 μL para os demais poços da respectiva microplaca. As amostras assim diluídas foram transferidas para a microplaca contendo o tapete celular (OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008).

Posteriormente ao período de incubação de 24 h a 37 °C e 5% de CO_2 , foram adicionados 15 μL de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/mL, incubando a microplaca por 3 h na mesma estufa. Quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento.

A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (O'BRIEN et al., 2000) e por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus - Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin[®].

5.1- Obtenção da droga vegetal

Após ser pulverizada em moinho de bolas obteve-se uma massa total de droga vegetal de 416,76 g.

5.2- Análises físico-químicas da droga vegetal

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas aplicadas à droga vegetal de *E. hyemale*, calculados a partir da média de três determinações e o desvio padrão encontrado para cada teste, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Análises físico-químicas para a droga vegetal de *E. hyemale*.

Teste	Droga vegetal
pH*	5,38 ± 0,07
Teor de umidade (% p/p)	6,75 ± 0,02
Perda por secagem**	53,16 ± 1,66%
Perda por secagem***	59,24 ± 1,54%
Teor de extrativos (% p/p)	21,66 ± 0,47
Teor de cinzas (% p/p)	16,06 ± 0,35%

*Água destilada pH 6,35 ± 0,14; **Temperatura ambiente; ***Estufa de secagem a 40 °C

5.3- Análises microbiológicas

Observou-se nos resultados obtidos no controle de qualidade microbiológico que não houve crescimento de micro-organismos patogênicos específicos, ou seja, *Salmonella* sp, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, além disso a contagem do número total

de bactérias foi de 2×10^2 UFC/g e de fungos foi de 7×10^2 UFC/g. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para a droga vegetal de *E. hyemale*.

Tabela 2- Controle de qualidade microbiológico da droga vegetal de *E. hyemale*

Micro-organismos	Droga vegetal de <i>E. hyemale</i>
Contagem do número total de bactérias	2×10^2 UFC/g
Contagem do número total de fungos	7×10^2 UFC/g
Presença de <i>Salmonella</i> sp. e <i>E.coli</i>	Ausentes
Presença de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Ausentes

5.4- Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários

Os resultados obtidos com a droga vegetal em análise para cada classe dos principais metabólitos secundários estão demonstrados na Tabela 3, na qual podemos observar a presença de saponinas e de flavonóides, confirmada apenas pela reação de saponinas e Taubock.

Tabela 3- Metabólitos secundários encontrados em *E. hyemale*

Classes	Reações	Droga vegetal
Alcalóides	Bertrand	-
	Bouchardat	-
	Dragendorff	-
	Mayer	-
Antraquinonas	Livres	-
	Heterosídicas	-
Flavonóides	Shinoda	-
	Taubock	+
	Pew	-
	Cloreto férrico	-
	Cloreto de alumínio	-
Glicosídeos Cardiotônicos	Legal	-
	Kedde	-
	Pesez	-
	Keller-Killiani	-
	Lieberman- Burchard	-
Saponinas	Formação e permanência de espumas	+
Taninos	Gelatina	-
	Sais de ferro	-
	Acetato de Chumbo	-

-: presença do metabólito não caracterizada; +: presença do metabólito caracterizada.

5.5- Obtenção de derivados vegetais de *E. hyemale*

Utilizando a percolação como metodologia de obtenção dos extratos visando obter um maior rendimento, a partir de cerca de 80 g da droga vegetal de *E. hyemale*, obteve-se diferentes rendimentos, segundo o líquido extrator utilizado. A obtenção de óleo essencial bruto a partir do espécime *E. hyemale* fresca, por hidrodestilação, após 5 horas ininterruptas demonstrou ter rendimento zero, dados que podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Massas dos derivados vegetais obtidos de *E. hyemale*

Material obtido	Líquido extrator	Droga (g)	Derivados vegetais (g)	Rendimento (%)
Extrato	Etanol 70%	80,21	12,16	15,16
Extrato	Metanol	80,17	7,40	9,23
Óleo essencial	Água destilada	100,00	0	0

5.6- Análises fitoquímicas

5.6.1- Perfil cromatográfico dos extratos de *E. hyemale* para fenóis

O sistema eluente *n*-butanol:ácido acético glacial:água (40:10:50, v/v/v) testado na otimização da CCD mostrou maior capacidade de separação na cromatoplaça. Na Figura 4 pode-se visualizar a cromatoplaça obtida dos extratos de *E. hyemale* em comparação com os padrões de compostos fenólicos.



Figura 4- Cromatoplaça dos extratos etanólico 70% e metanólico obtidos das partes aéreas de *E. hyemale* revelado com NP/PEG. Sistema eluente: *n*-butanol:ácido acético glacial:água (40:10:50, v/v/v). Em A- quercetina R_f 0,91; B- canferol R_f 0,93; C- rutina R_f 0,73; D- ácido clorogênico R_f 0,72; E- extrato etanólico 70% R_f 0,84 para a 1ª mancha e 0,55 para a 2ª; F- extrato metanólico R_f 0,84 para a 1ª mancha e 0,55 para a 2ª.

5.6.2- Perfil cromatográfico dos extratos de *E. hyemale* para saponinas

O sistema eluente clorofórmio:metanol:água (65:50:10, v/v/v) testado na otimização da CCD mostrou maior capacidade de separação das saponinas na cromatoplaça. Na Figura 5 pode-se visualizar a cromatoplaça obtida dos extratos de *E. hyemale* em comparação com o padrão de saponina.

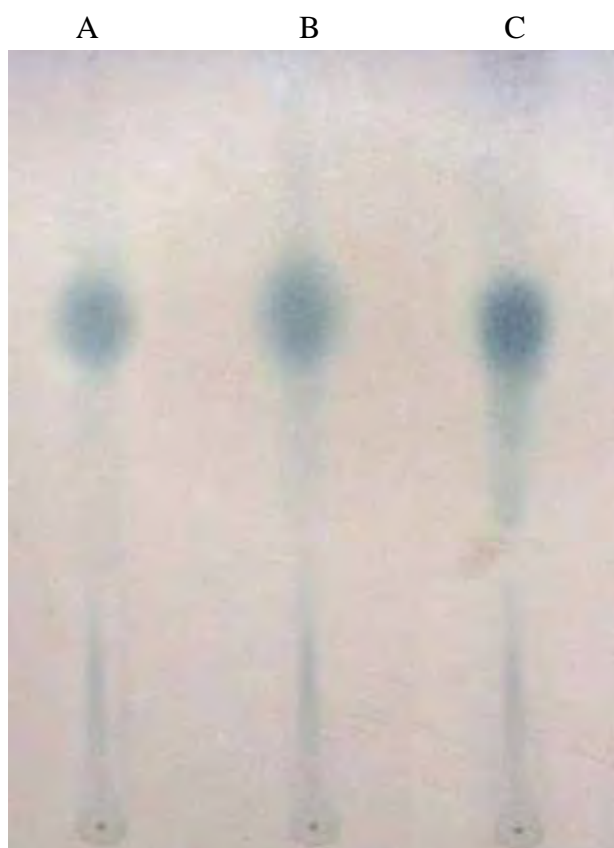


Figura 5- Cromatoplaça dos extratos etanólico 70% e metanólico obtidos das partes aéreas de *E. hyemale* revelado com vanilina sulfúrica. Sistema eluente: clorofórmio:metanol:água (65:50:10, v/v/v). Em A- padrão de saponina R_f 0,67; B- extrato etanólico 70% R_f 0,67; C- extrato metanólico R_f 0,67.

5.6.3- Espectrofotometria na região de ultravioleta

O perfil espectrofotométrico dos compostos fenólicos padrão, ácido gálico e ácido tânico, bem como o perfil dos extratos de *E. hyemale* estão representados na Figura 6.

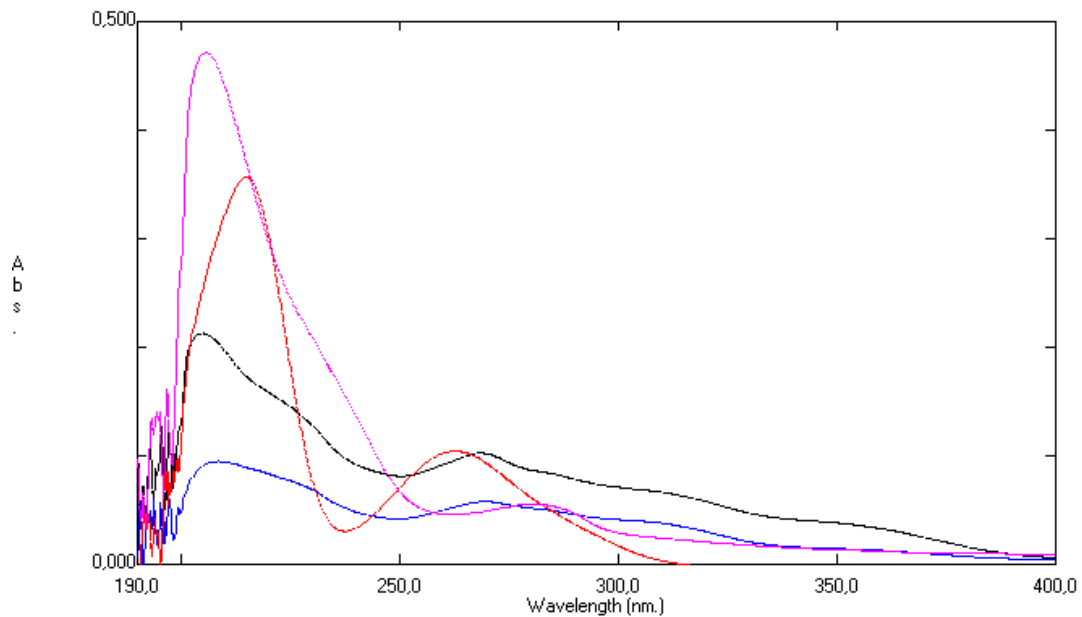


Figura 6: Perfil espectrofotométrico, na região do ultravioleta. Espectro em vermelho: ácido gálico; espectro em violeta: ácido tânico; espectro em preto e azul: extratos EtOH 70% e MeOH, respectivamente.

Observando o espectro apresentado na Figura 6, verifica-se que o perfil dos extratos de *E. hyemale* apresentam compostos que absorvem entre 200 a 250 nm e 250 a 300 nm assim como os compostos fenólicos padrão.

5.7- Teste de hemólise

O resultado do teste de hemólise pode ser observado na Figura 7, nota-se que, apesar de os extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* apresentarem presença de saponinas nas reações fitoquímicas preliminares e no perfil cromatográfico, a quantidade presente deste composto em ambos os extratos não foi capaz de causar lise celular na placa de ágar sangue para todas as concentrações testadas. Observa-se ainda ao centro da placa a formação de um halo de hemólise de 15 mm do controle positivo realizado com SDS.

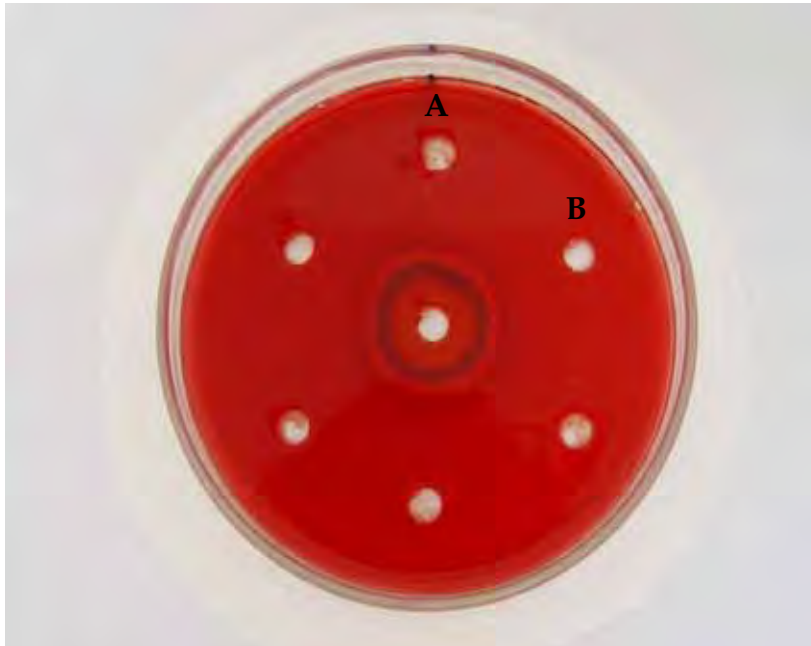


Figura 7: Capacidade de hemólise dos extratos de *E. hyemale*. A, B e C: extrato etanólico 70% (250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente. D, E e F: extrato metanólico (250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente. G: halo de hemólise formado pelo controle positivo.

5.8- Determinação da atividade antimicrobiana

5.8.1- Método de difusão em ágar

A identificação dos halos de inibição pode ser visualizada na Figura 8. Observa-se que não houve formação de halos para os extratos etanólico 70% e metanólico na concentração de 5 mg/mL e que os controles de DMSO e solução salina não apresentaram formação de halo de inibição contra as bactérias e *C. albicans* em estudo. O halo de inibição dos controles de ampicilina e anfotericina B variou entre 10 e 25 mm. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

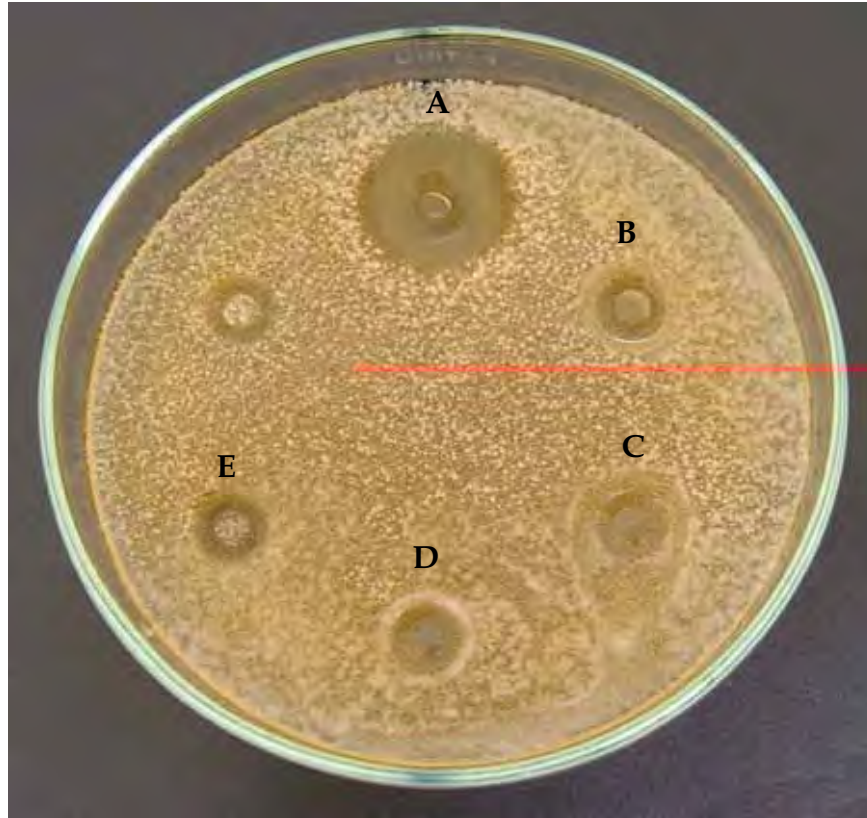


Figura 8: Halos de inibição mostrados no método de difusão em ágar com “templates”. Placa com crescimento de *C. albicans*. A: anfotericina B (halo de 20 mm); B: extrato etanólico 70%; C: extrato metanólico de *E. hyemale*; D e E: controles com DMSO e solução salina, respectivamente.

Tabela 5- Medida dos halos de inibição do teste de difusão em ágar, a partir da média de triplicatas, para os extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale*

Amostras	Halo (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
EtOH 70%	-	-	-	-
MeOH	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-
Solução salina	-	-	-	-
Ampicilina/ Anfotericina B	14,5	10	25	20

- : não houve formação de halo

5.8.2- Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM), da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Os resultados de CIM, CBM e CFM encontrados para o extrato etanólico 70% e para o extrato metanólico foram $> 1250 \mu\text{g/mL}$ frente a todas as cepas bacterianas exceto micro-organismos bucais e *Candida albicans*.

Os resultados de CIM e CFM encontrados para os fungos dermatófitos variaram entre 625 e 1250 $\mu\text{g/mL}$. Os controles com ampicilina variaram de 0,02 $\mu\text{g/mL}$ a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ frente às cepas bacterianas, o controle com anfotericina B frente *Candida albicans* foi igual a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e frente aos fungos dermatófitos, variou entre 0,25 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados podem ser observados na Tabela 6.

Os resultados de CIM encontrados para os micro-organismos bucais variaram entre 500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, o controle com clorexidina variou entre 1,83 a 14,75 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados podem ser observados na Tabela 7.

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão representadas microplacas com alguns resultados obtidos frente aos diferentes micro-organismos.

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hymale*. Os valores expressos representam a média de triplicatas.

Micro-organismos	Extrato Etanólico 70% (µg/mL)			Extrato Metanólico (µg/mL)			Controles (µg/mL)					
							Ampicilina			Anfotericina B		
	CIM	CBM/CFM		CIM	CBM/CFM		CIM	CBM/CFM		CIM	CBM/CFM	
<i>S. aureus</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	0,39	0,39	NA	NA	0,39	NA
<i>S. epidermidis</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	0,78	0,78	NA	NA	0,78	NA
<i>B. subtilis</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	0,02	0,02	NA	NA	0,02	NA
<i>E. coli</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	0,78	0,78	NA	NA	0,78	NA
<i>P. aeruginosa</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	0,78	0,78	NA	NA	0,78	NA
<i>C. albicans</i>	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	NA	NA	0,5	0,5	NA	0,5
<i>T. rubrum</i>	1250	1250	1250	625	625	625	NA	NA	1	1	NA	1
<i>T. menthagrophyts</i>	1250	>1250	1250	1250	1250	1250	NA	NA	1	1	NA	1
<i>M. canis</i>	1250	1250	1250	625	625	625	NA	NA	0,25	0,25	NA	0,25

NA: não se aplica

Tabela 7- Resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à micro-organismos bucais. Os valores expressos representam a média de triplicatas.

Micro-organismo	Extrato etanólico 70% ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Extrato metanólico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Controle Clorexidina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>E. faecalis</i>	2000	2000	14,75
<i>S. salivarius</i>	1000	1000	7,38
<i>S. sanguinis</i>	1000	1000	7,38
<i>S. mitis</i>	1000	500	14,75
<i>S. mutans</i>	2000	1000	1,83
<i>S. sobrinus</i>	1000	1000	1,83
<i>L. casei</i>	2000	2000	3,67

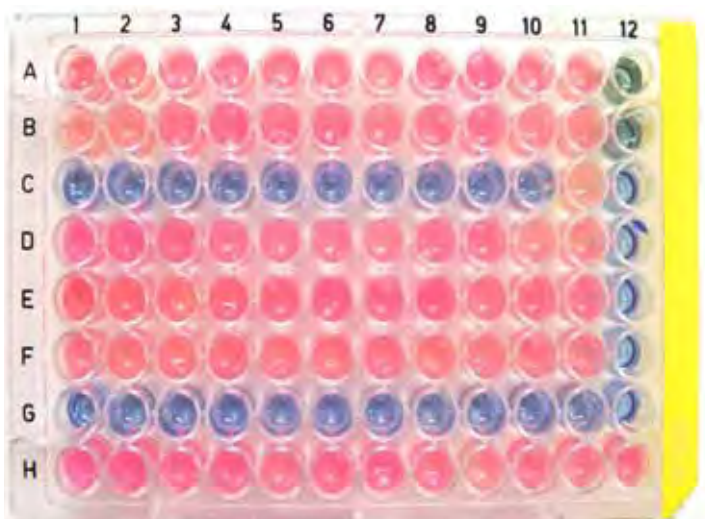


Figura 9- Determinação da CIM frente a uma cepa bacteriana, revelado com resazurina. As concentrações dos extratos variaram de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estão representados de A1 a A11 o extrato etanólico 70% e de B1 a B11 o extrato metanólico. Na linha C está a representação da ampicilina, na linha D do DMSO. Nos orifícios de A12 a H12 estão representados os controles. A/B12 de esterilidade do extrato metanólico, C/D12 do extrato etanólico 70%, E12 do DMSO, F/G12 do caldo e H12 do crescimento da cultura.



Figura 10- Determinação da CIM frente *C. albicans*, revelado com TTC. As concentrações dos extratos variaram de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estão representados de A1 a A11 o extrato etanólico 70% e de B1 a B11 o extrato metanólico. Na linha C está a representação da anfotericina B, na linha D do DMSO. Nos orifícios de A12 a H12 estão representados os controles. A/B12 do crescimento da cultura, C12 do DMSO, D12 do caldo, E/F12 do extrato etanólico 70%, G/H12 do extrato metanólico.

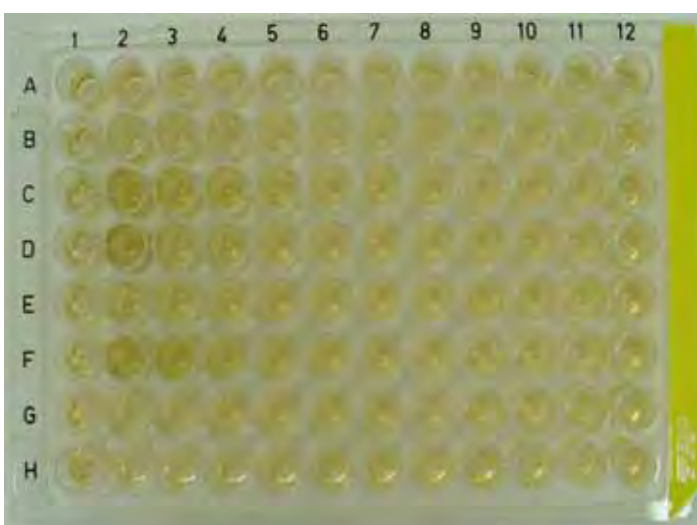


Figura 11- Determinação da CIM frente a fungos filamentosos, observação visual e comparação com controles. As concentrações dos extratos variaram de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estão representados de C2 a C11 o extrato metanólico e de D2 a D11 o extrato etanólico 70%. Na linha H está a representação da anfotericina B, na linha G do DMSO. Nos orifícios de A1 a H12 estão o controle do meio (negativo), nas linhas de A12 a H12 estão representados os controles de crescimento fúngico (positivo) (para comparação visual).

5.9- Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres.

O potencial da atividade antioxidante dos extratos foi determinado baseado na atividade sequestrante do radical de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), utilizando três concentrações definidas de uma substância com reconhecida atividade antioxidante e avaliando o potencial dos extratos obtidos neste trabalho. A atividade antioxidante, em porcentagem e o desvio padrão, da vitamina C e dos extratos, em suas definidas concentrações, está apresentada na Figura 12.

A análise estatística mostrou que a capacidade antioxidante foi significativamente diferente entre o controle positivo e os extratos, porém a capacidade antioxidante não se mostrou significativamente diferente entre os extratos avaliados.

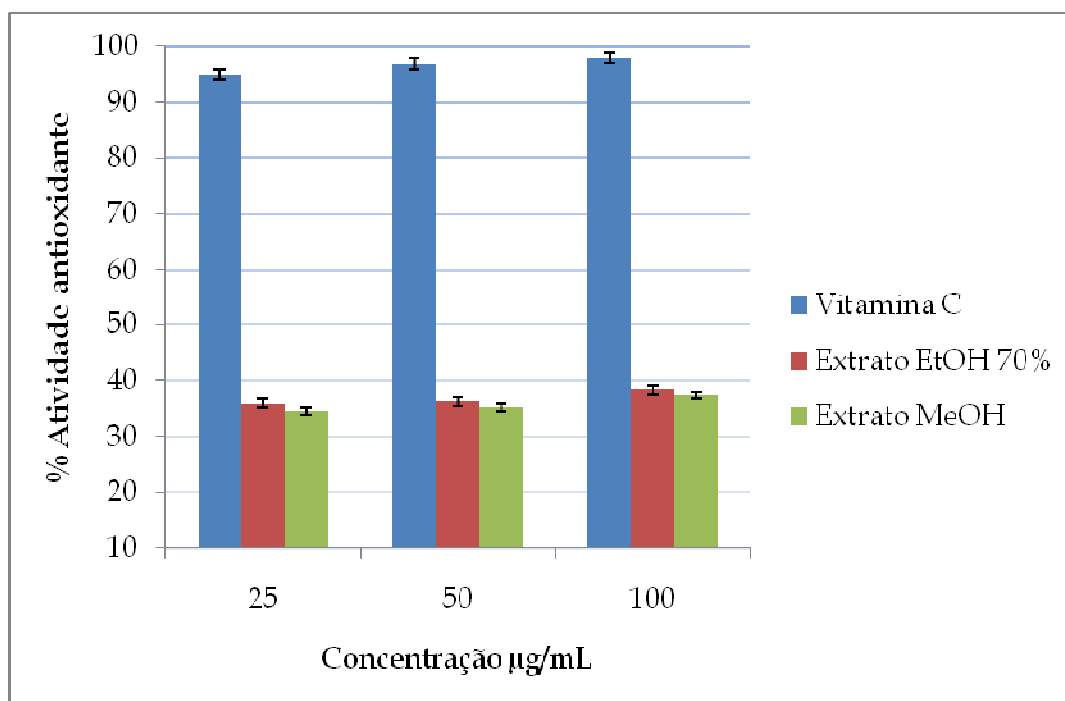


Figura 12- Atividade antioxidante da substância padrão e dos extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

5.10- Avaliação da citotoxicidade

A partir da avaliação de citotoxicidade determinou-se o Índice de Citotoxicidade (IC) ou de Viabilidade, para os extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale*.

Observou-se um Índice de Citotoxicidade para 50% das células (IC₅₀) frente às linhagens de fibroblastos e de macrófagos para o extrato metanólico na faixa de concentração de 1000-2000 µg/mL. Para o extrato etanólico 70% não houve IC₅₀ na viabilidade celular frente a fibroblasto para a maior concentração testada (2000 µg/mL), enquanto que no caso da linhagem de macrófagos houve IC₅₀ na faixa de concentração de 1000-2000 µg/mL.

Na Figura 13 pode ser observado o desempenho de citotoxicidade dos extratos de *E. hyemale* frente às linhagens de fibroblastos e macrófagos.

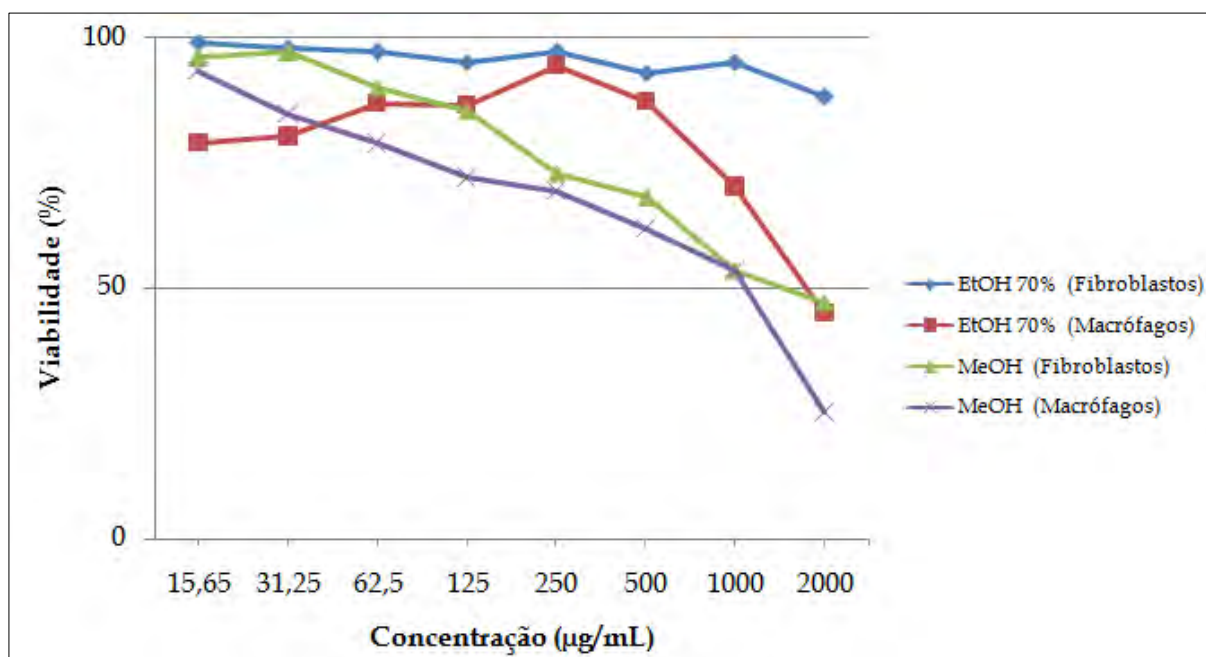


Figura 13- Desempenho da atividade citotóxica dos extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* em diferentes concentrações, frente a fibroblastos e macrófagos

O Brasil possui uma das maiores e mais variadas floras do mundo, a constituição das plantas indica suas possíveis propriedades biológicas, podendo abranger tanto propriedades terapêuticas como tóxicas (FALKENBERG et al., 2004).

Observou-se a partir dos estudos de caracterização físico-química da droga vegetal de *E. hyemale* que o pH do infuso é ácido, sugerindo a presença de substâncias ácidas neste espécime.

O teor de umidade foi igual a 6,75%, a presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de micro-organismos, com conseqüente deterioração dos constituintes da droga. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais que, em geral, devem estar abaixo de 14% (SIMÕES, 2004). Nota-se que o valor encontrado se apresenta dentro do limite pré-estabelecido.

A perda por secagem realizada em temperatura ambiente e em estufa de secagem a 40 °C mostrou que neste último caso, houve maior perda de água da droga vegetal além do fato de ter ocorrido rápida estabilização da droga, por isso essa foi a metodologia de escolha para a secagem das partes aéreas de *E. hyemale*. Além disso, sabe-se que a secagem em temperatura ambiente em alguns casos pode favorecer o desenvolvimento de contaminantes (MIGLIATO et al., 2007).

O teor de extrativos emprega a água como líquido extrator no estabelecimento do teor de constituintes extraíveis da droga vegetal. A análise foi determinada utilizando-se a decocção como processo extrativo. O resultado obtido foi de 21,66%, este parâmetro avalia apenas a quantidade de substâncias que podem ser extraídas aplicando-se o método de decocção e tendo como líquido extrator a

água e não tem relação com a quantidade de princípios ativos contidos na planta uma vez que se deve levar em consideração a substância que se deseja extrair, sendo necessário em alguns casos o emprego de misturas de diferentes solventes (MIGLIATO et al., 2007).

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes na droga como contaminantes (SIMÕES et al., 2004; VIGO et al., 2004). Como não existe valor de teor de cinzas totais, na literatura, para a droga vegetal de *E. hyemale*, o resultado obtido neste trabalho torna-se importante contribuindo para o processo de sua padronização, além disso, o valor encontrado pode ter relação com a presença de sílica relatada na literatura como constituinte desta espécie (GIERLINGER et al., 2008; SAPEI et al., 2008).

Os resultados obtidos no controle de qualidade microbiológico mostraram que não houve crescimento de micro-organismos patogênicos específicos, ou seja, *Salmonella* sp, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e que na contagem do número total de micro-organismos o crescimento esteve de acordo com as recomendações oficiais para plantas medicinais (BRASIL, 2010), mostrando as boas práticas de coleta e manuseio dessa droga vegetal.

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos presentes em espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a triagem fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma (FALKENBERG et al., 2004). Os resultados encontrados na triagem fitoquímica da droga de *E. hyemale* mostraram a

presença de saponinas e flavonóides, sendo estes metabólitos secundários de maior polaridade, os solventes de escolha para a extração foram etanol 70% e metanol. A escolha dos solventes deve basear-se, principalmente, na seletividade que o mesmo apresenta pelos compostos a serem extraídos. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, custo, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST e SCHMIDT, 2000).

A percolação consiste em submeter uma droga vegetal pulverizada ou uma mistura de substâncias em um aparelho especial, o percolador, à ação dissolvente de um líquido extrator de maneira que este, ao atravessar o pó em sua descida, arraste as substâncias solúveis e saia do percolador livre de substâncias insolúveis. Quando a operação é executada convenientemente, a primeira porção do líquido obtido, ou percolato, deve estar quase saturada dos constituintes solúveis da droga tratada e, se a quantidade do líquido extrator for suficiente para seu esgotamento, a última porção do percolato deve ser quase incolor, inodoro e sem sabor da droga esgotada (PHARMACOPEIA, 1926).

Por meio do estudo do perfil cromatográfico é possível determinar e visualizar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais. Após a obtenção dos extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* realizou-se o estudo do perfil cromatográfico, de modo que a cromatoplaça apresentou manchas na mesma condição utilizada para observação de compostos fenólicos, contudo não foi observada a presença de quercetina, rutina, canferol ou ácido clorogênico, padrões utilizados para comparação com os extratos. A espectrofotometria na região de

ultravioleta também mostrou picos semelhantes aos observados nos padrões fenólicos utilizados.

Os fenóis obtidos de vegetais são numerosos e variados, estando representados em quase todas as classes de metabólitos secundários. Os flavonóides são compostos fenólicos que têm sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano (C₆C₃C₆), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central (SANTOS e BLATT, 1998). Diante dos resultados encontrados neste trabalho de pesquisa nota-se a necessidade de estudos futuros mais apurados no intuito de se detectar dentre essas várias classes quais seriam os fenóis apresentados.

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2000). Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo os radicais livres e prevenindo a formação de doenças, contribuindo, dessa maneira, para uma maior longevidade. A origem de várias doenças degenerativas, como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares, entre outras, está relacionada aos danos promovidos pelos radicais livres. Sugere-se que utilização de vegetais ricos em substâncias antioxidantes pode diminuir a incidência de algumas dessas doenças (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As pesquisas vêm tentando explicar os benefícios de compostos antioxidantes em enfermidades cardiovasculares, em numerosos tipos de câncer, além de outras doenças diretamente associados ao processo de envelhecimento, como cataratas, Síndrome de Alzheimer e outras que atingem o sistema nervoso (SOUSA et al., 2007).

Segundo Milovanović et al. (2007) extratos hidroalcoólicos (20:80, v/v) de cinco espécies de *Equisetum* (*E. arvense* L.; *E. sylvaticum* L.; *E. fluviatile* L.; *E. palustre* L.; *E. telmateia* Ehrh) apresentaram grande variação em sua capacidade antioxidativa, no entanto, esses autores concluem que a atividade antioxidante não tem relação direta com a presença de flavonóides como estabeleceu Katalinic et al. (2006), justificando que esta variação depende não somente da presença e quantidade total de fenóis mas sim da composição específica destes fenóis, uma vez que foram observadas também variações com relação aos tipos de flavonóides identificados em cada espécime. Após a análise destes resultados os autores qualificam as espécies *E. telmateia*, *E. arvense* e *E. sylvaticum* como ricas fontes naturais antioxidantes.

De acordo com Park e Jeon (2008), o extrato metanólico de *E. hyemale* apresentou boa capacidade antioxidante, apresentando na concentração de 100 µg/mL pelo método de DPPH inibição de 24,29%, enquanto que os resultados obtidos neste estudo mostram valores de inibição de radicais livres acima de 30%, de maneira semelhante aos resultados encontrados por Pan et al. (2009).

Os extratos de *E. hyemale* apresentaram também perfil para a presença de saponinas. Segundo Estrada et al. (2000) as saponinas são muito utilizadas na indústria farmacêutica servindo como o ponto de partida para a semi-síntese de drogas esteroidais. Além disso, estes autores afirmam que as saponinas possuem propriedades importantes como, por exemplo, no tratamento de desordens associadas à inflamação, sendo utilizadas em fitoterapia e ainda na indústria cosmética.

Acredita-se que este grupo de metabólitos secundários seja o principal componente de muitas plantas utilizadas empiricamente na medicina tradicional chinesa como, por exemplo, *Panax ginseng*, que passou a ser utilizado mundialmente (FUKUDA et al., 2000), sendo que as saponinas são consideradas responsáveis por suas propriedades farmacológicas (LIU e HENKEL, 2002).

As saponinas têm habilidade de romper eritrócitos, devido a uma interação que ocorre com os esteróides presentes na membrana destes, esta propriedade vem conduzindo a testes de hemólises com a finalidade de se descobrir a presença deste metabólito em drogas ou extratos de plantas (BAUMANN et al., 2000). O teste de hemólise realizado neste estudo mostrou que apesar de os extratos de *E. hyemale* apresentarem um perfil cromatográfico com presença de saponinas, não existe provavelmente, concentração suficiente destes compostos capaz de causar lise celular ou ainda sugerem que as saponinas presentes em ambos os extratos de *E. hyemale* não possuam essa capacidade (SIMÕES, 2004).

Após a análise dos resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana observa-se que os extratos de *E. hyemale* não mostraram formação de halo de inibição pela técnica de “templates” na concentração de 5 mg/mL frente a todas as cepas testadas. Os resultados obtidos pelo método de determinação da CIM mostraram melhor atividade de ambos os extratos frente a fungos dermatófitos com CIM e CFM variando de 625 a 1250 µg/mL e frente aos micro-organismos bucais com CIM variando de 500 a 2000 µg/mL, porém a CIM, CBM e CFM foram superiores a 1250 µg/mL frente a todas as bactérias não bucais testadas e *C. albicans*.

Espécies do gênero *Equisetum* apresentaram em estudos prévios, relativa atividade antimicrobiana (ALONSO PAZ et al., 1995; UZUN et al., 2004; KLOUCEK et al., 2005; CANALES et al., 2005; MILOVANOVIĆ et al., 2007).

Em estudo realizado com decocto de *E. giganteum* pelo método de difusão em ágar com cilindros observou-se a formação de halos na concentração de 10 mg/mL frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *M. luteus*, não apresentando atividades frente a *C. albicans* e *S. cerevisiae* (ALONSO PAZ et al., 1995).

Em um levantamento sobre várias plantas medicinais peruanas, avaliou-se o extrato etanólico de *E. giganteum* por microdiluição em caldo na máxima concentração de 16 mg/mL, os resultados observados foram CIM > 16 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa* e CIM entre 4 e 16 mg/mL para *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. fragilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes* (KLOUCEK et al., 2005).

Um estudo realizado com plantas da Turquia demonstrou atividade com o extrato de éter de petróleo de *E. telmateia* com CIM variando nas concentrações entre 39,1 e 312,5 µg/mL frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. albicans*, sendo que o extrato etanólico desta mesma espécie vegetal não apresentou resultados frente a estes mesmos micro-organismos (UZUN et al., 2004).

De acordo com Milovanović et al. (2007) o extrato hidroalcoólico (20:80, v/v) de cinco espécies de *Equisetum* (*E. arvense* L.; *E. sylvaticum* L.; *E. fluviatile* L.; *E. palustre* L.; *E. telmateia* Ehrh) na concentração de 5 µg de extrato por disco frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger* mostraram formação de halos de 7,8 a 17,9 mm, sendo que não houve atividade

somente do espécime vegetal *E. telmateia* frente ao *S. aureus*, além do fato de os melhores resultados serem observados para *E. arvense*.

Estudos relacionados à atividade antimicrobiana da espécie *E. hyemale* mostram uma variação nos resultados obtidos devido as diferentes metodologias empregadas, concentrações e micro-organismos testados (NAVARRO et al., 1996; LEE et al., 2001; CANALES et al., 2005).

Canales et al. (2005) observaram em um levantamento com plantas de uso popular no México que o extrato hexânico de *E. hyemale* frente a *S. aureus* mostrou um valor de CIM >2 mg/mL. Lee et al. (2001) observou que o extrato metanólico de *E. hyemale* na concentração 10 mg/disco não apresentou atividade antibacteriana frente a micro-organismos da flora intestinal inclusive *E. coli*. O estudo realizado por Navarro et al. (1996) com o extrato metanólico de *E. hyemale* na concentração de 20 mg/mL mostrou atividade frente a *S. aureus* e na concentração de 40 mg/mL frente a *C. albicans*.

Analisando-se os vários estudos de atividade antimicrobiana realizados com o gênero *Equisetum* presentes na literatura, observa-se em primeiro lugar o quanto as espécies deste gênero são utilizadas popularmente pelas mais variadas etnias e ainda a variação nas metodologias utilizadas e nos resultados obtidos. Nota-se a semelhança em alguns casos com os resultados obtidos neste estudo com atividade antimicrobiana se apresentando em altas concentrações dos extratos. Contudo em nenhum dos estudos prévios foram testados extratos de *E. hyemale* frente a fungos dermatófitos e micro-organismos bucais.

Apesar de alguns autores afirmarem que a Concentração Inibitória Mínima ideal para extratos obtidos de plantas devem estar abaixo de 100 µg/mL (RÍOS e RECIO, 2005; GIBBONS, 2008) observa-se que apesar de os extratos de *E. hyemale* terem apresentado altas concentrações que estas se mostram promissoras quando comparadas com os dados encontrados na literatura para extratos de *E. hyemale* obtidos em outras regiões. O fato de os primeiros resultados encontrados no início deste estudo não terem sido considerados bons, não impediu a realização de testes frente a outras linhagens de micro-organismos o que permitiu a interessante descoberta de um potencial antimicrobiano frente a fungos dermatófitos. Tais micro-organismos apresentam altos índices de resistência, sendo, portanto necessários estudos futuros a fim de gerar frações ou até mesmo substâncias isoladas a partir destes extratos que possuam ação mais significativa frente a estes micro-organismos.

Além de avaliar a eficiência dos extratos de *E. hyemale* como possíveis inibidores de micro-organismos e antioxidantes procurou-se verificar a segurança destes. Para tanto, utilizou-se a metodologia de determinação de morte celular referente a uma avaliação preliminar da toxicidade dos extratos, segundo Ahmed et al. (1994) e Vistica et al. (1991). Foram utilizados dois tipos celulares, as células fibroblásticas da linhagem SIRC que são preconizadas pela ANVISA (ANVISA, 2003) e células de macrófagos J774, uma vez que os testes *in vitro* com células animais ou humanas são uma das potenciais alternativas aos testes de toxicidade com animais (HAMMER et al., 2006).

Em estudo de citotoxicidade realizado por Park e Jeon (2008) pelo método de MTT observa-se que o extrato metanólico de *E. hyemale* não apresentou IC₅₀ na máxima concentração testada (1000 µg/mL).

Os resultados de testes de citotoxicidade realizados neste estudo demonstram que o extrato etanólico 70% apresenta baixo Índice de Citotoxicidade, quando em contato com fibroblastos, não apresentando IC₅₀ na máxima concentração testada (2000 µg/mL), enquanto que quando em contato com macrófagos apresentou IC₅₀ na faixa entre 1000-2000 µg/mL. O extrato metanólico apresentou IC₅₀ frente a ambos os tipos celulares entre a faixa de 1000-2000 µg/mL, ou seja, apresentando maior citotoxicidade quando comparado ao extrato etanólico 70%. A alta concentração necessária para produzir citotoxicidade em 50% da população de células é um indicativo da segurança do uso destes extratos.

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO NETO e LOPES, 2007). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, além disso, há que se considerar também o pressuposto que os solos apresentam diferenças na sua fertilidade e que este fator pode levar a diferenças na produção de metabólitos de interesse (KUTICHAN, 2001).

Os resultados apresentados sugerem devido à variedade de estudos relacionados ao gênero *Equisetum* e com a espécie *E. hyemale* distribuídos por diferentes países, que essas variações influenciam na capacidade de uma espécie apresentar atividades biológicas significativas uma vez que estas estão diretamente relacionadas a presença de metabólitos secundários produzidos naturalmente pelas plantas.

A importância do presente estudo está nas informações obtidas nos testes de caracterização farmacognóstica e fitoquímicas preliminares e ainda na relação entre os metabólitos secundários encontrados e as atividades biológicas apresentadas pelo espécime *E. hyemale* cultivado em Araraquara.

A partir da análise dos resultados obtidos, conclui-se que:

- A caracterização da droga vegetal de *E. hyemale* foi importante devido a ausência destes dados na literatura;
- As análises fitoquímicas preliminares sugerem a presença de compostos fenólicos e ainda saponinas nos extratos etanólico 70% e metanólico obtidos por percolação;
- Os extratos etanólico 70% e metanólico de *E. hyemale* não apresentaram atividade antibacteriana exceto para micro-organismos bucais e antifúngica frente a *C. albicans*;
- Estes extratos demonstraram melhor atividade frente a fungos dermatófitos e micro-organismos bucais;
- Os extratos de *E. hyemale* possuem boa atividade antioxidante;
- Do ponto de vista toxicológico os extratos apresentam baixo Índice de Citotoxicidade até mesmo em concentrações elevadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S.M.; HERRON, J.; FALLON-FRIEDLANDER, S.; HAUFFE, S.; HOROWITZ, A.; RIVIÈRE, G.J. Pharmacokinetics of terbinafine in young children treated for *tinea capitis*. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 24, p. 886-91, 2005.

ABOTT, S. L. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jørgensen, J. H.; Tenover, M.A.; Tenover, R. H. **Microbiology**. ASM Press: Washington: DC, cap. 41, p. 684-700, 2003.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**. v. 170, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA, L.M.M.; SOUZA, E.A.F.; BIANCHIN, D.B.; SVIDZINSKI, T.I.E. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 249-255, 2009.

ALONSO PAZ, E.; CERDEIRAS, M.P.; FERNANDEZ, J.; FERREIRA, F.; MOYNA, P.; SOUBES, M.; VÍZQUEZ, A.; VERO, S.; ZUNINO, L. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, p. 67-70, 1995.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 de setembro de 2009.

ARAÚJO, A.L.; OHARA, M.T. Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas em feiras de São Paulo e de infusos derivados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.36, n.1, p.129-137, 2000.

ARGUETA, A.; CANO, L.; RODARTE M. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**, México, D.F., Instituto Nacional Indigenista, p. 1-3, 1994.

BARA, M.T.F.; CIRILO, H.N.C.; OLIVEIRA, V. Determinação de ginkgo flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 1, p. 1-7, 2004.

BARILE, F.A. **Principles of toxicology testing**. CRC Press. Boca Raton, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química nova**. v 29, p. 113-123, 2006.

BARROS, T. **O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos**. Ed. Atheneu. São Paulo, 1995.

BAST, A.; CHANDLER, R.F.; CHOY, P.C., DELMULLE, L.M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S.B.A.; KELLER, K.; KOEMAN, J.H.; PETER, P.; PRZYREMBEL, H.; RENWICK, A.G.; VERMEER, I.T.M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 12, p. 195-211, 2002.

BAUER R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug Standards be achieved? **Drug Information Journal**. v. 32, p. 101-110, 1998.

BAUMANN, E.; STOYA, G.; VÖLKNER, A.; RICHTER, W.; LEMKE, C.; LINSS, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. **Acta Histochemica**. v. 102, p. 21-35, 2000.

BAYTELMAN, B. Etnobotânica en el estado de Morelos. **Metodología e introducción al estudio de 50 plantas de La zona norte del estado de Morelos**, México, D.F, INAH, p. 280, 1980.

BELLINI, M.; ANGELI, L.; MATUO, R.; TEREZAN, A.; RIBEIRO, L.; MANTOVANI, M. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**. v. 20, p. 355-360, 2006.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M.T.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 5, p. 56-59, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANGER, S.; CASALTA, J.P.; HABIB, G. Escherichia coli endocarditis: seven new cases in adults and review of the literature. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**. v. 24, p. 537- 541, 2005.

BRASIL. Portaria nº 116, de 8 de agosto de 1996. Publica proposta de normas para estudos da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. **Diário oficial da União**. 12/08/1996.

BRASIL. Resolução nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências conforme Seção III. **Diário oficial da União**. 09/03/2010.

BRASIL. Resolução nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos conforme Anexo I. **Diário oficial da União**. 16/03/2004.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. **European Academy of Dermatology**. v. 17, p. 663-669, 2003.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12 supl., p. 132-135, 2002.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 179-189, 2000.

CANALES, M.; HERNANDEZ, T.; CABALLERO, J.; ROMO de VIVAR, A.; AVILA, G.; DURAN, A.; LIRA, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 429-439, 2005.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, p. S58-S65, 2000.

CAPONI, S.N.C.; BITTENCOURT, S.C.; FALKENBERG, M.B. O uso das plantas medicinais sob prescrição médica: pontos de diálogo e controvérsias com o uso popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, p. 89-91, 2003.

CARFI, M.; GENNARI, A.; MALEABA, I.; CORSINI, E.; PALLARDY, M.; PIETERS, R.; VAN LOVEREN, H.; VOHR, H.W.; HARTUNG, T.; GRIMALDO, L. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. **Toxicology**. v. 229, p. 11-22, 2007.

CDC. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from January 1992-June2001. **American Journal of Infection Control**. v. 29, p. 404-421, 2001.

CHÉRIGO, L. PEREDA-MIRANDA, R. FRAGOSO-SERRANO, M. JACOBO-HERRERA, N. KAATZ, G.W. GIBBONS, S. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. **J Natural Products**. v. 71, p. 1037-1045, 2008.

CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, S.Y.; HIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**. v. 181-182, p. 581-586, 2002.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**. v. 39, p. 756-761, 2006.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable citotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing for yeasts. Approved Guideline. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, CLSI document M7-A7, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, CLSI document M2-A9, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing os yeasts; approved standard, CLSI document M27-A3, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing os yeasts; Third

Informational Supplement, approved standard, CLSI document M27-S3, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, p. 599-607, 2003.

CORREA, P.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 5, 1984.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1 e v. 2, 1994.

COSTA, R.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.; JORDÃO, B. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assay. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 118, p. 86-93, 2008.

CRIPPA, F. Problems of pharmaceutical technics with plant extracts. **Fitoterapia**. v. 49, p. 257-263, 1978.

CRUZ, A.S.; BARBOSA, M.L.; PINTO, T.J.A. Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 1-9, jan./jun., 2004.

DANIELSKI, L., MICHIELIN, Z. E, FERREIRA, R. S. S. J. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Food Engineering**. v. 78, p. 1054–1059, 2007.

DAVID, J.P.; SILVA, E.F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M.L.S.; ASSUNÇÃO, R.J.; DAVID, J.M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, 2007.

DEPARDIEU, F.; BONORA, M.G.; REYNOLDS, P.E.; COUVALIN, P The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 931-948, 2003.

DO MONTE, F.H.; DOS SANTOS, J.G. JR.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V.M.; LEAL, L.K.; CUNHA, G.M. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**. v.49, p. 239-243, 2004.

DOMINGO, P.; FONTANET, A. Management of complications associated with totally implantable ports in patients with Aids. **AIDS patient care and STDs**. v.15, p. 7–13, 2001

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M. DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 14, supl. 01, p. 6-8, 2004.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**. v. 64, p. 711-713, 1998.

ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998

ESTRADA, A.; KATSELIS, G.S.; LAARVELD, B.; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**. v. 23, p. 27-43, 2000.

ESTRELLA, M.C.; TUDELA, J.R.T. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 19, p. 133-138, 2002.

EUN-YOUNG, P.; HOON, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Equisetum hyemale*. **Natural Product Sciences**. v. 14, p. 239- 243, 2008.

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**. 4 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC p.229-245, 2004.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu. 1988.

FERREIRA, L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n.1, p. 61-8, 1997.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O' GANA J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, p. 957-973, 2005.

FRIDKIN, S.K Vancomycin-Intermediate and -Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, p. 108-115, 2001.

FUJIMOTO, J.; SAWA, T.; FRANK, D.W.; WIENER-KRONISH, J.P. Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Journal of Infectious Diseases**. v. 183, p. 1767-1774, 2001.

FUKUDA, N., TANAKA, H., SHOYAMA, Y. Isolation of the pharmacologically active saponin Ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 283–285, 2000.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiology Methods**. v. 50, p. 63-73, 2002.

GEIGER, H.; REICHERT, S.; MARKHAM, K. R. Herbacetin-3- β -D-(2- β -Dglucopyranosidoglucoopyranoside)-8- β -D-glucoopyranoside and gossypetin-3- β -D-(2-O- β -Dglucopyranosidoglucoopyranoside)-8- β -D-glucoopyranoside, two new flavonol-glycosides from *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae). **Zeitschrift für Naturforschung, organische Chemie**. v. 37B, p. 504-507, 1982.

GELATTI, L.C.; SUKIENNIK, T.; BECKER, A.P.; INOUE, F.M.; CARMO, M.S.; CASTRUCCI, F.M.S.; PIGNATARI, A.C.C.; RIBEIRO, L.C.; BONAMIGO, R.R.; D'AZEVEDO, P.A. Sepsis due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. **Planta Medica**. v. 74, p. 594–602, 2008.

GIERLINGER, N.; SAPEI, L.; PARIS, O. Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. **Planta**. v. 227, p. 969-980, 2008.

GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**. v. 25, p. 138-149, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**. v. 43, p. 1367-1378, 2002.

GURBUZA, I.; YESILADAB, E.; ITOC, S.; GURBUZ, I. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 121, p. 60-365, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.616-625, 2006.

HANCOCK, R.E.; SPEERT, D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resistance Updates**. v. 3, p. 247-255, 2000.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.411-413, 1999.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; IGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 3, jul./set., 2008.

JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 25, n. 2, p. 225-231, 1993.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; SAURACALIXTO, F. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 1686-1690, 2000.

KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. EDITORIAL/ **International Journal of Medical Microbiology**. v. 295, p. 355–35, 2005.

KARLSSON, J. Antioxidants and exercises. **Human Kinetics**, USA, 1997.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**. v. 94, p. 550–557, 2006.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p. 309–312, 2005.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**. v. 125, p. 58–60, 2001.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELLO, NT. **Tratado de Micologia Médica**. 9 edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

LANG, N.P.; MOMBELLI, A.; ATTSTROM, R. Placa e Cálculo Dental. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

LEE, H.S.; BEON, M.S.; KIM, M.K. Selective Growth Inhibitor toward Human Intestinal Bacteria Derived from *Pulsatilla cernua* Root. **Journal of agricultural and food chemistry**.v. 49, p.4656-4661, 2001.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliações em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, p. 3, 2001.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Florida: CRC Press. 1989.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Florida: CRC Press. 2000.

LIU, J.; HENKEL, T. Traditional Chinese medicine (TCM): are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? **Current Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 1483–1485, 2002.

LIU, Z.Q. Chemical Methods to Evaluate Antioxidant Ability. **Chemical reviews**. v. 110, p. 5675–5691, 2010.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MACÊDO, D.P.C.; SILVA, V.K.A.; FARIAS, A.M.A.; MELO, L.R.B.; WILHEIM, A.B.; NEVES, R.P. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 1-7, 2008.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botânica Barsilica**. v. 21, n. 2, p. 263-275, 2007.

MARSH, P.D. Are dental diasesexamples of ecological catatrophes?. **Microbiology**. v. 149, p. 279- 294, 2003.

MASSEY, R.C.; HORSBURGH, M.J.; LINA, G.; HÖÖK, M.; RECKER M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, p. 953-958, 2006.

McCANN, M.T.; GILMORE, B.F.; GORMAN, S.P. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 60, n. 12, p. 1551 -1571, 2008.

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

MENICHETTI, S.M.; AVERSA, M.C.; CIMINO, F.; CONTINI, A.; VIGLIANISI, C.; TOMAINO, A. Synthesis and “double-faced” antioxidant activity of polyhydroxylated 4-thiaflavans. **Organic & biomolecular chemistry**. v. 3, p. 3066-3072, 2005.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 94-101, jan/mar 2007.

MILOVANOVIĆ, V.; RADULOVIĆ, N.; TODOROVIĆ, Z.; STANKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, G. Antioxidant, Antimicrobial and Genotoxicity Screening of Hydroalcoholic Extracts of Five Serbian *Equisetum* Species. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 62, p. 113-119, 2007.

MISIARA, A.C.O. Considerações Médicas sobre Pacientes com Problemas Respiratórios. In: BRUNETTI, M.C. **Periodontia Médica**. São Paulo: SENAC, 2004.

MITICH, L.W. Horsetail. **Weed Technology**. v. 6, n. 3, p. 779-781, 1992.

MORAIS, T.M.N.; SILVA, A.; AVI, A.L.R.O.; SOUZA, P.H.R.; KNOBEL, E.; CAMARGO, L.F.A. Importance of Dental Work in Patients under Intensive Care Unit. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 18, n. 4, p. 412-417, out-dez, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4^a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2004.

NARVAI, P.C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 5, n. 2, p. 381-392, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidiumforming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-A. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard-M7-A6, ed. 6, v. 23, 2003.

NAVARRO V.; VILLARREAL L.; ROJAS G.; LOZOYA X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p. 143-147, 1996.

NEVES, R.P.; CAVALCANTI, M.A.Q.; CHAVES, G.M.; MAGALHÃES, O.M.C. Yeasts isolated from clinical samples of AIDS patients. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 363-364, 2002.

NUCCI, M.; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 521-526, 2005.

O' GARA, J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 270, p. 179-188, 2007.

O' BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**. v.267, p.5421-5426, 2000.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**. v.102-103, p.569-573, 1998.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, M.K. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1995.

OLIVEIRA, J.A.A.; BARROS, J.A.; CORTEZ, A.C.A.; OLIVEIRA, J.S.R.L. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 81, p. 238-243, 2006

OLIVEIRA, S.M.M.; LORSCHIEDER, J.A.; NOGUEIRA, M.A. Avaliação da Ação *In Vitro* de Gel Dentifrício Contendo Óleos Essenciais sobre Bactérias Cariogênicas. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 2, p. 266-269, 2008.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Pautas para avaliação de medicamentos herbários**. Genebra, 1993.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307, Abr./Jun. 2008.

PAN, C.H.; LEE, J.Y.; SONG, D.G.; KIM, J.H.; AHN, S.Y.; BAE, D.S.; KIM, Y.H.; LEE J.K. Antioxidant and Aldo-keto Reductase Family 1 B10 Inhibition Activities of Korean Local Plant Extracts. **Journal of Applied Biological Chemistry**. v. 52, n. 4, p. 216-220, 2009.

PANNIZA, S.; SCAVONE, O.; ROCHA, A.B e CHRISTODOULOU, M. Emprego medicinal de plantas importadas e sucedâneas que ocorrem no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 4, p. 227-38, 1982.

PARK, E.Y; JEON H. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Equisetum hyemale*. **Natural Product Sciences**. v.14, n. 4, p. 239-243, 2008.

PARKINS, M.D.; GREGSON, D.B.; PITOUT, J.D.; ROSS, T.; LAUPLAND, K.B. Population-Based Study of the Epidemiology and the Risk Factors for *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection. **Infection**. v. 38, n. 1, p. 25-32, 2010.

PERÓN, M.L.D.F.; TEIXEIRA, J.J.V.; SVIDZINSKI, T.I.E. Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranavaí- Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 37, p. 77-81, 2005.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 21-24, 2003.

PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**. v. 49, p. 364-368, 1997.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil.1.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

PHARMACOPEIA the United States USP 26,. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention Inc; 2003.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 81-98, 261- 280, 2003.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REED, G.H. Foodborne Illness (Part 8) Escherichia coli. Dairy. **Food and Environmental Sanitation**. v. 14, n. 6, p. 329-330, 1994.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS>. Acesso: 04 de setembro de 2010.

RENNÓ, L.R. A Flora Brasileira como fonte de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 70-76, 1971.

RICHARDSON, M.; LASS-FLORL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 14, p. 5-24, 2008.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 80-84, 2005.

ROBERTS, D.T.; TAYLOR, W.D.; BOYLE, J. Guidelines for treatment of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**. v. 10, p. 148:402, 2003.

ROGERO, S.O; LUGÃO, A.B; IKEDA, T.I; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROY-BURMAN, A.; SAVEL, R.H.; RACINE, S.; SWANSON, B.L.; REVADIGAR N.S.; RUIZ, L.H.; VELÁZQUEZ, A.L.L.; PANDURO, A.; MONDRAGÓN, P.; BELTRÁN, M.L.M.. Fitoterapia de la hepatitis viral B crónica. v. 9, n. 3, 2007. Disponível em: www.medigraphic.com. Acesso em: 24 de março 2010.

SALLUM, A.W.; MARTINS, A.G.; SALLUM, E.A. A Doença Periodontal e o Surgimento de um Novo Paradigma. In: BRUNETTI, M.C. **Periodontia Médica**. São Paulo: SENAC, 2004.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 21, n. 2,1998.

SAPEI, L.; NÖSKE, R.; STRAUCH, P.; PARIS, O. Isolation of Mesoporous Biogenic Silica from the Perennial Plant *Equisetum hyemale*. **Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society**. v. 20, p. 2020-2025, 2008.

SEGNER, H.; LENZ, D.; HANKE, W.; SCHÜÜRMAN, G. Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. **International Symposium Toxicity Assessment and on-line monitoring**. v. 9, n. 4, p. 273-279, 1994.

SEHNEM, A. Equisetáceas. *In*: Reitz, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Herb. Barbosa Rodrigues. Itajaí, 1984.

SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2001.

SIMONI, I.C.; FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H. Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (OCHINACEAE) em células de córnea de coelho SIRC. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 69, n. 4, p. 95-97, out/dez, 2002.

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

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e Atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, O.V.S.; OLIVEIRA, M.S.; RABELLO, S.V.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S.; LEITE, M.N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip.- Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, s. 1, p. 50-53, 2003.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.1, p. 48-53, Jan./Mar. 2010.

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochmatia polymorpha* spp. *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n. 4, p. 525-530, 2006.

STOVER, C.K.; PHAM, X.Q.; ERWIN, A.L.; MIZOGUCHI, S.D.; WARRENER, P.; HICKEY, M.J.; BRINKMAN, F.S.; HUFNAGLE, W.O.; KOWALIK, D.J.; LAGROU, M.; GARBER, R.L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, .L.L.; COULTER, S.N.; FOLGER, K.R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G.K.; PAULSEN, I.T.; REIZER, J.; SAIER, M.H.; HANCOCK, R.E.; LORY, S.; OLSON, M.V. Letters to Nature. **Nature**. v. 406, p. 959-964, 2000.

STRATTON, C.W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**. v. 18, p. 57-64, 2000.

SUI, C.; WANG, Y.; WANG, C. An assay of kaempferol in the ethanol extract of *Equisetum hiemale* L. **Shenyang Pharmaceutical University**. v. 13, n. 2, p. 121-124, 1996.

SUI, C.; WU, L.; YANG, J.; WANG, Y.; YU, D.; ZHANG, W. Constituents of the petroleum ether extract of *Equisetum hiemale*. **Shenyang Pharmaceutical University**. v. 14, n. 4, p. 294-295, 1997.

SYRCHINA, A.I.; ZAPESOCHNAYA, G.G.; TYUKAVKINA, N.A.; VORONKOV, M.G. Glycosides of *Equisetum arvense* flavones. **Khimiia Prirodnikh Soedinenii**. v. 3, p. 413-414, 1980.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**. v. 22, p.760-770, 2008.

UNAL, S.; MASTERTON, R.; GOOSSENS, H: Bacteraemia in Europe–antimicrobial susceptibility data from the MYSTIC surveillance programme. **Journal Antimicrobial Agents**. v. 23, p. 155–163, 2004.

UZUN, E.; SARIYARA, G.; ADSERSENB, A.; KARAKOCC, B.; ÖTÜK, G.; OKTAYOGLUA, E.; PIRILDAR, S. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, p. 287–296, 2004.

VAN BEEK, T.A.; WINTERMANS, M.S. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. **Journal of Chromatography**. v. 930, p. 109-117, 2001.

VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Advances in dental research**. v. 7, p. 87-96, 1993.

VEIT, M.; BECKERT, C.; HÖHNE, C.; BAUER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *equisetum* subgenus *equisetum**. **Phytochemistry**. v. 38, n. 4, p. 881-891, 1994.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer research**. v. 51, n. 10, p. 2515-20, 1991.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 481-489, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WALTER, E.; STAMM, S.; NORRBY, R. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. **Journal of Infectious Diseases**. v. 183-Suppl 1, p. 1-4, 2001.

WANG, F.M.; YAO, T.W.; ZENG, S. Disposition of quercetin and kaempferol in human following an oral administration of *Ginkgo biloba* extract tablets. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 28, p 173-177, 2003.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Facultad de Farmacia y Bioquímica**. v. 1, p. 7-81, 1963.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 4-8, 2007.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998.

WU, T.H.; YEN, F.L.; LIN, L.T.; TSAI, T.R.; LIN, C.C.; CHAM, T.M. Preparation, physicochemical, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 346, p. 160-168, 2008.

XU, C.F.; BIAN, X.Y.; QU, S.M.; YOU, L.H.; QI, Z.M.; CHENG, W.; LIU, X.J.; LIU, W.Z.; REN, S.J. Effect of *Equisetum hyemale* on experimental hyperlipemia in rats and its toxic test. **China Journal of Chinese Materia Medica**. v. 18, p. 52-53, 1993.

YI, J.H.; PARK, I.K.; CHOI, K.S.; SHIN, S.C.; AHN, Y.J. Toxicity of medicinal plant extracts to *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 11, p. 221-223, 2008.

YOON, K. R.; WROLSTAD, R.E. Investigation of Marion Blackberry, Strawberry, and Plum Fruit for the Presence of Saponins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 32, n. 3, 691-693, 1984.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. (Editores Yunes, R.A & Calixto, J.B.) ed Argos Universitária, Santa Catarina, 2001.

ZEIGLER, D.R.; PRÁGAI, Z.; RODRIGUEZ, S.; CHEVREUX, B.; MUFFLER, A.; ALBERT, T.; BAI, R.; WYSS, M.; PERKINS, J. B. The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. **Journal of Bacteriology**. v. 190, n. 21, p. 6983-6995, 2008.

ZIEBUHR, W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. **Contributions to Microbiology**. v. 8, p. 102-107, 2001.