

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

*Equisetum giganteum* L.: parâmetros de controle de qualidade, análise química e  
desenvolvimento de extrato seco por *spray drying*

LEANDRO NICOLODI FRANCESCATO

PORTO ALEGRE, 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

*Equisetum giganteum* L.: PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE,  
ANÁLISE QUÍMICA E DESENVOLVIMENTO DE EXTRATO SECO POR *SPRAY*

*DRYING*

Tese apresentada por **Leandro Nicolodi Francescato** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amélia Teresinha Henriques

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquiria Linck Bassani

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de fevereiro de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. George González Ortega  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues  
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dr. Silvia Laura Debenedetti  
Universidad de Belgrano, Argentina

Francescato, Leandro Nicolodi  
Equisetum giganteum L.: parâmetros de controle de  
qualidade, análise química e desenvolvimento de  
extrato seco por spray drying / Leandro Nicolodi  
Francescato. -- 2012.  
247 p.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.  
Orientadora: Valquíria Linck Bassani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2012.

1. Equisetum giganteum. 2. Controle de qualidade.  
3. Cromatografia. 4. Flavonóides. 5. Spray drying. I.  
Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Bassani,  
Valquíria Linck, orient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nas dependências dos Laboratórios de Farmacognosia e de Desenvolvimento Galênico (LDG), fazendo uso de equipamentos da Central Analítica (PPGCF), do Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) e do Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS); todos pertencentes à Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, RS. Alguns experimentos foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA, da UFRGS e no Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas – NAPO, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. O projeto de pesquisa desenvolvido neste trabalho contou com suporte do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), sendo o aluno contemplado com bolsa de estudos do Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais do Ministério da Educação, REUNI/CAPES/MEC.



Dedico este trabalho  
a todos que acreditaram e  
participaram desta jornada,  
principalmente aos meus pais  
Zilda e Alcidor (Sidóca)  
e a Cintia, minha companheira





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que passaram pela minha vida contribuindo com o meu crescimento pessoal, e tantos outros que direta ou indiretamente participaram deste trabalho. Cabe ressaltar algumas destas pessoas, que estiveram mais presentes durante a realização deste trabalho.

Ao programa de bolsas REUNI de Assistência ao Ensino pela bolsa de estudos e pela contribuição para minha formação docente, e à CAPES e CNPq pelo financiamento do projeto.

Agradeço às Professoras Dr<sup>as</sup>. Amélia T. Henriques e Valquiria Linck Bassani pela oportunidade, pela orientação, pelo exemplo de postura científica e pela confiança em meu trabalho, que tornaram meu aprendizado mais desafiante e prazeroso.

Aos professores que possibilitaram a realização deste trabalho por meio da disponibilização de instalações e equipamentos: José Angelo Zuanazzi, Pedro Ros Petrovick, George González Ortega, Paulo Mayorga, Pedro Fröhlich, Ana Maria Bergold, Miriam Apel, Tiana Tasca e Grace Gosmann da Faculdade de Farmácia; Erna Vogt de Jong e Caciano Pelayo Noreña do ICTA - UFRGS; Carlos Pérez Bergmann do Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) - UFRGS; e Marcos Antonio Martins, Nilo Zanatta e Helio Bonacorso do NAPO – UFSM.

Aos botânicos Sérgio Bordignon, Rosana Moreno Senna da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul e Maria Angélica Kieling-Rubio do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS pelo auxílio botânico com as amostras.

A todos os co-autores das publicações relacionadas a esta tese.

À Prof<sup>a</sup> Merion Campos Bordas e muitos outros professores que contribuíram para minha formação pedagógica e me mostraram que o processo ensino-aprendizagem pode e deve ser diferente.

Ao professor George González Ortega e principalmente aos colegas Vinicius Claudino Bica, Francini Yatsu e Samuel Kaiser pelas contínuas discussões e contribuições ao longo de todo trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia e do Laboratório de Desenvolvimento Galênico que me acolheram e tanto me ensinaram. Além dos anteriormente citados, especialmente agradeço pela contribuição científica: Carolina, Raquel, Marina, Douglas, Roger, Ana Aboy, Dayane e Cabral.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e paciência, principalmente aos de Santo Augusto pela compreensão nos momentos de ausência.

À Cintia, pelo carinho, companheirismo, incentivo e compreensão.

A Deus por colocar em meu caminho tantas pessoas especiais, pela força e por me mostrar o verdadeiro aprendizado e a beleza da vida.

*Se andarmos pelos caminhos que  
outros já percorreram,  
chegaremos no máximo  
aos lugares que eles atingiram.*

Alexander Graham Bell



## RESUMO

As partes aéreas de *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae), espécie nativa da América do Sul, denominada cavalinha e rabo-de-cavalo, são utilizadas popularmente sob a forma de infuso ou decocto no tratamento de afecções urinárias e hepáticas e principalmente como diurética, hemostática, adstringente, remineralizante e emagrecedora. Entretanto, poucos estudos científicos foram realizados envolvendo esta espécie. Quanto às propriedades biológicas de seus extratos, têm sido relatadas atividades diurética e antimicrobiana, e ausência de efeitos tóxicos agudos em camundongos, quando administrados por via oral. Considerando a ampla disponibilidade de *E. giganteum* no mercado brasileiro e o seu potencial terapêutico, torna-se necessária a definição de parâmetros de controle de qualidade para a matéria-prima vegetal, bem como o desenvolvimento de produtos padronizados. Assim, este trabalho objetivou avaliar parâmetros de controle de qualidade e estabelecer critérios químicos que permitam diferenciar *E. giganteum* de outras espécies do gênero e, a partir de uma solução extrativa aquosa, desenvolver extrato seco por *spray drying* e caracterizá-lo. Para isso, partes aéreas de *E. giganteum* e outras espécies disponíveis foram utilizadas. Análises comparativas destas amostras foram realizadas por CCD, CLAE e teor de flavonóides totais. Para *E. giganteum*, o teor de cinzas, os constituintes fenólicos e flavonóides totais foram determinados por método espectrofotométrico no UV/VIS. Análise por CCD foi realizada em placas de gel de sílica; fase móvel acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26); e detecção com reagente Natural / UV a 365 nm. Análises por CLAE dos extratos metanólicos foram realizadas empregando coluna de fase-reversa (C18) e detector de arranjo de diodos. O material vegetal foi também submetido à hidrólise ácida, a qual foi otimizada empregando Desenho Composto Central Rotacional e Análise de Superfície de Resposta para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise. As agliconas correspondentes aos flavonóides heterosídicos foram extraídas e analisadas por método de CLAE previamente validado. O teor de flavonóides totais foi avaliado por ensaio colorimétrico com cloreto de alumínio a 425 nm. Análises por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM também foram realizadas na intenção de caracterizar os compostos fenólicos presentes em *E. giganteum*. Uma solução extrativa aquosa foi obtida por decocção a partir da matéria-prima vegetal e

posteriormente seca por *spray drying* empregando equipamento NIRO<sup>®</sup> atomizer semi-industrial. O extrato seco obtido foi então caracterizado. Os resultados demonstraram para *E. giganteum* um teor de cinzas totais e insolúveis em ácido (a 600°C) respectivamente de  $20,07 \pm 0,21\%$  e  $13,75 \pm 0,39\%$ . O teor de fenólicos totais foi de  $7,27 \pm 0,05$  mg equivalente a ácido gálico por grama, e de  $0,420 \pm 0,014$  g% para os flavonóides totais. Na análise por CCD de *E. giganteum* foi verificada a presença de manchas características de polifenóis, sendo que, na análise por CLAE, alguns constituintes apresentaram espectro de UV característicos de derivados do ácido cinâmico e do canferol. A diferenciação entre *E. giganteum* e *E. arvense*, e em menor extensão para *E. hyemale* e *E. bogotense*, foi possível através do perfil cromatográfico obtido nas análises por CCD e CLAE. A possível presença de tiamina foi caracterizada por CCD nestas amostras. Nas condições ótimas de hidrólise determinadas para *E. giganteum*, canferol e, em menor teor, quercetina foram encontradas. A análise comparativa das agliconas dos flavonóides por CLAE e dos flavonóides totais por espectrofotometria revelou similaridades químicas entre *E. giganteum*, *E. hyemale* e *E. bogotense*, mas não para *E. arvense*, o qual apresentou um perfil de agliconas distinto. A maior parte dos compostos fenólicos puderam ser caracterizados em *E. giganteum* por meio da análise por CLAE-EM/EM, sendo encontrado principalmente derivados heterosídicos do canferol, mas também outros compostos fenólicos raros. A obtenção de extrato seco por *spray drying* a partir de solução extrativa aquosa de *E. giganteum* mostrou-se viável, com alto rendimento do processo (85,6%). O produto foi caracterizado como um pó fino com baixa densidade, baixa fluidez e alta umidade residual, mas baixa atividade de água. Com relação a sua composição química, o extrato seco apresentou alto teor de minerais e açúcares redutores. A presença na droga vegetal e no extrato seco de *E. giganteum* de alto teor de minerais, corrobora seu uso como remineralizante. Os resultados obtidos neste trabalho representam as primeiras contribuições para o estabelecimento de parâmetros e métodos para a caracterização e o controle de qualidade da droga vegetal de *E. giganteum*. A viabilidade de produção e a caracterização do extrato seco obtido contribuem para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e a avaliação de outras atividades biológicas.

**Palavras-chave:** *Equisetum giganteum*, controle de qualidade, CCD, CLAE-DAD, flavonóides, espectrometria de massas, extrato seco por *spray drying*, fitoterápicos.

## ABSTRACT

Aerial stems of *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae, traditional name: "horsetail"), a native plant from South America, are used in folk medicine for treating kidney and hepatic illness, due to their diuretic, hemostatic, adstringent, remineralizant and weight loss properties. However, few scientific studies have been performed regarding this species. Concerning the biological properties, diuretic and antimicrobial activities, as well as no oral acute toxicity in mice have been reported. Considering the large availability of the *E. giganteum* in the Brazilian market and its therapeutic potential, the definition of the quality control parameters for the raw material, as well as the development of standardized products with well-established biological activities becomes necessary. Thus, the aim of this work was to establish identification methods and to evaluate quality control parameters for the *E. giganteum* raw material in order to compare this species with others of the genus, as well as to develop and to characterize a spray-dried product from an aqueous *E. giganteum* extractive solution. Dried aerial stems of *E. giganteum* and other species available were employed in the comparative analysis by TLC, HPLC and UV/VIS total flavonoid content. The ash content was determined. Total phenolic and flavonoid contents were determined by UV/VIS spectrophotometric method. The TLC analysis was carried out on silica gel plates; mobile phase ethyl acetate:formic acid:glacial acetic acid:water (100:11:11:26); and detection with Natural Product reagent / UV at 365 nm. HPLC analysis of methanol extracts was performed with a C18 column and a diode-array detector. The plant raw material was also submitted to acid hydrolysis which was optimized using Central Composite Rotational Design and Response Surface Analysis for investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time. The corresponding flavonoid aglycones were extracted and analyzed by a previously validated HPLC method. Total flavonoid content was measured also by aluminium chloride colorimetric assay at 425 nm. In attempt to characterize phenolic compounds in *E. giganteum*, HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis were performed. An aqueous extractive solution (AES) was prepared by decoction of *E. giganteum* grounded stems using water. The resulting AES was spray-dried using a Niro Production Minor equipped with rotary atomizer (GEA, Copenhagen, Denmark). The spray-dried extract was then characterized. The content of total ash and acid-insoluble ash (at 600 °C) in *E. giganteum* stems were  $20.07 \pm 0.21\%$  and  $13.75 \pm$

0.39% (mean  $\pm$  S.D.), respectively. The total phenolic content was  $7.27 \pm 0.05$  mg expressed as gallic acid equivalent per gram (GAE/g), and the total flavonoid content was  $0.420 \pm 0.014$  g% (w/w). In the TLC of *E. giganteum* was verified the presence of spots characteristic of polyphenols. The HPLC fingerprint revealed the existence of some constituents with UV spectra characteristics of cinnamic acid and kaempferol derivatives. The differentiation between *E. giganteum* and *E. arvense*, and in a minor extension for *E. hyemale* and *E. bogotense*, was possible by the chromatographic profile in TLC and HPLC analysis. The possible presence of thiamine was characterized by TLC in these samples. In the optimum condition found for hydrolysis of *E. giganteum* raw material, quercetin and kaempferol aglycones were found. The comparative analysis of flavonoids aglycones using HPLC and total flavonoids spectrophotometric methods revealed similarities between *E. giganteum*, *E. hyemale* and *E. bogotense*, but not for *E. arvense*, which showed a distinct profile of aglycones. The HPLC-MS/MS analysis of *E. giganteum* hydroethanol extractive solution allowed to characterize some flavonoids heterosides, mainly quercetin and kaempferol derivatives, and other rare compounds. The spray-dried extract (SDE) of *E. giganteum* was obtained with a high process yield (85.6%) and characterized as a very fine powder with low density, poor flowability and high loss on drying, but low water activity. The high content of reducing sugars and minerals, represented by total ash, was also observed in the SDE and can explain some these characteristics. The high content of sugars and minerals in the SDE also corroborate the traditional use of the plant as remineralizant. The results obtained in this study represent one of the first contributions to the establishment of parameters and methods for the characterization and quality control of raw material of *E. giganteum*. The feasibility of production and subsequent characterization of dried extract obtained contributes to the development of new pharmaceuticals products and to the evaluation of new biological activities.

**Key-words:** *Equisetum giganteum*, quality control, TLC, HPLC-DAD, flavonoids, mass spectrometry, spray-dried extract, herbal medicines.



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.1** Distribuição das espécies do gênero *Equisetum* nos subgêneros *Equisetum* e *Hippochaete* ..... 44

**Tabela 1.2** Usos populares/tradicionais, com finalidades medicinais, relatados para as partes aéreas de *E. giganteum* ..... 52

### CAPÍTULO 2

**Table 1.** Saturated salt solutions and their corresponding relative humidity . 81

**Table 2.** Extractable matter of the *E. giganteum* air-dried powder ..... 83

**Table 3.** Total ash and acid-insoluble ash of the *E. giganteum* air-dried powder ..... 83

### CAPÍTULO 3

**Tabela 3.1** Listagem das amostras de *Equisetum* utilizadas neste trabalho 92

**Tabela 3.2** Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE de soluções extrativas de diferentes espécies de *Equisetum* ..... 97

**Tabela 3.3** Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE, Método A ..... 98

**Tabela 3.4** Parâmetros cromatográficos utilizados na análise das soluções extrativas de *E. giganteum*, *E. arvense* e *E. hyemale* ..... 99

**Tabela 3.5** Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE, Método B ..... 100

**Tabela 3.6** Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de *E. giganteum*, obtida por sonicação durante 30 min a 25 °C, empregando diferentes líquidos extratores ..... 126

<b>Tabela 3.7</b> Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de <i>E. giganteum</i> , obtida por extração sob agitação durante 60 min a 25 °C, empregando diferentes líquidos extratores .....	127
--	-----

<b>Tabela 3.8</b> Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de <i>E. giganteum</i> , obtida por extração sob agitação durante 15 min a 60 °C, empregando diferentes líquidos extratores .....	128
--	-----

<b>Tabela 3.9</b> Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de <i>E. giganteum</i> , obtida por extração empregando-se sonicação durante 30 min e etanol 50% como líquido extrator .....	130
---	-----

#### CAPÍTULO 4

<b>Table 1.</b> Retention time, UV absorptions, negative and positive ion mode ESI-MS and negative ion mode ESI-MS/MS data of phenolic compounds presents in hydroethanolic extract of <i>E. giganteum</i> stems .....	146
--	-----

<b>Table 2.</b> Flavonols derivatives and styrylpyrone presents in <i>E. giganteum</i> and already reported for <i>E. arvense</i> , <i>E. hyemale</i> and <i>E. bogotense</i> .....	158
---	-----

<b>Table 3.</b> Calibration curves, LOD and LOQ data of flavonoids aglycones determined by LC-UV .....	159
--	-----

<b>Table 4.</b> Calculated <i>t</i> -values of the factors effects on area, retention time, and peak width, of quercetin and kaempferol from P-B design .....	160
---	-----

<b>Table 5.</b> Experimental conditions, including factors and levels tested, of the Central Composite Rotational Design, and experimental and predicted yields of quercetin and kaempferol in <i>E. giganteum</i> raw material, after acid hydrolysis .....	161
--	-----

<b>Table 6.</b> Content of total flavonoids, expressed as isoquercitrin, and content of quercetin and kaempferol in <i>E. giganteum</i> , <i>E. arvense</i> , <i>E. hyemale</i> , and <i>E. bogotense</i> .....	164
---	-----

## CAPÍTULO 5

<b>Table 1.</b> Chemical and technological characteristics of the <i>Equisetum giganteum</i> spray-dried extract .....	180
--	-----

<b>Table 2.</b> Specific mineral content in the <i>Equisetum giganteum</i> and the corresponding spray-dried extract determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry .....	184
---	-----

<b>Table 3.</b> Retention time, UV absorptions, negative ion mode ESI-MS and ESI-MS/MS data of phenolic compounds presents in SDE .....	187
---	-----



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.1** *Equisetum giganteum* L.: partes aéreas estéreis e partes aéreas no período reprodutivo de exemplares adultos, e aspecto geral de um exemplar jovem ..... 46

**Figura 1.2** Estrutura dos principais alcalóides relatados para o gênero *Equisetum* ..... 51

### CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Adsorption and desorption isotherms of *E. giganteum* air-dried powder material, obtained at  $25 \pm 2$  °C in controlled relative humidity atmospheres ..... 83

**Figure 2.** TLC of *E. giganteum* methanolic extract and references substances: caffeic acid, chlorogenic acid and rutin ..... 84

**Figure 3.** LC fingerprint of *E. giganteum* stems aqueous extract ..... 84

### CAPÍTULO 3

**Figura 3.1** Análise comparativa por CCD frações de alcalóides totais de *E. giganteum*, *E. hyemale*, *E. arvense*, cápsulas de *E. arvense*, *E. bogotense* e substância de referência nicotina ..... 103

**Figura 3.2** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais da matéria-prima vegetal e dos extratos de duas amostras de *E. giganteum*, e substância de referência nicotina ..... 104

**Figura 3.3** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais de *E. giganteum* e substância de referência nicotina ..... 105

**Figura 3.4** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais de *E. bogotense*, *E. arvense*, cápsulas de *E. arvense*, *E. giganteum*, *E.*

<i>hyemale</i> e substância de referência tiamina .....	107
<b>Figura 3.5</b> Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico, etanólico e aquoso de <i>E. giganteum</i> ; extrato metanólico de <i>E. arvense</i> ; e substâncias de referência rutina, ácido clorogênico e isoquercitrina .....	109
<b>Figura 3.6</b> Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico de diferentes amostras de <i>Equisetum</i> e substâncias de referência .....	110
<b>Figura 3.7</b> Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico de diferentes amostras de <i>Equisetum</i> e substâncias de referência .....	111
<b>Figura 3.8</b> Cromatograma de <i>E. bogotense</i> proveniente de coleta na Argentina, obtido por CLAE-UV a 285 nm .....	115
<b>Figura 3.9</b> Cromatogramas de <i>E. hyemale</i> proveniente de coleta em Mostardas/RS e amostras comerciais, obtidos por CLAE-UV a 285 nm .....	115
<b>Figura 3.10</b> Cromatogramas de <i>E. giganteum</i> proveniente de coleta em Santo Antônio da Patrulha/RS, amostras comerciais e matérias-primas comercializadas no Brasil, obtidos por CLAE-UV a 285 nm .....	116
<b>Figura 3.11</b> Cromatogramas de amostras Argentinas de <i>E. giganteum</i> , amostra comercial e provenientes de coletas, obtido por CLAE-UV a 285 nm .....	117
<b>Figura 3.12</b> Cromatograma de amostra comercial de <i>Equisetum</i> proveniente de Madrid/Espanha, obtido por CLAE-UV a 285 nm .....	118
<b>Figura 3.13</b> Cromatograma de cápsulas contendo pó de <i>E. arvense</i> procedente da França, obtido por CLAE-UV a 285 nm .....	118
<b>Figura 3.14</b> Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de <i>E. giganteum</i> proveniente de coleta em Santo Antônio da Patrulha/RS, com representação do espectro de UV dos principais picos .....	119
<b>Figura 3.15</b> Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de <i>E. bogotense</i> proveniente de coleta na Argentina, com representação do	

espectro de UV dos principais picos .....	121
<b>Figura 3.16</b> Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de amostra comercial de <i>E. hyemale</i> , com representação do espectro de UV dos principais picos .....	122
<b>Figura 3.17</b> Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de cápsulas contendo pó de <i>E. arvense</i> procedente da França, com representação do espectro de UV dos principais picos .....	123
<b>Figura 3.18</b> Cromatogramas comparativos de soluções extrativas metanólicas purificadas de <i>E. hyemale</i> , <i>E. giganteum</i> e <i>E. arvense</i> , a 280 nm. Espectro de UV dos sinais característicos de ácido fenólicos e flavonóides .....	125
<b>Figura 3.19</b> Cromatograma a 280 nm da solução extrativa de <i>E. giganteum</i> (amostra 1), obtida através de extração por sonicação durante 30 min, empregando-se etanol 50% como líquido extrator .....	131
<b>Figura 3.20</b> Perfil cromatográfico do extrato metanólico de <i>E. giganteum</i> após nebulização com solução metanólica de DPPH <sup>•</sup> a 0,2% .....	132
 CAPÍTULO 4	
<b>Figure 1.</b> LC-DAD chromatogram at 254 nm of the hydroethanolic extract of <i>E. giganteum</i> ; LC-ESI-MS (negative ion mode) total ion current chromatogram of the hydroethanolic extract of <i>E. giganteum</i> .....	145
<b>Figure 2.</b> MS/MS [M-H] <sup>-</sup> at CID energies of 10, 20, 30, 50, and 70 V for compound 2, kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside .....	150
<b>Figure 3.</b> MS/MS [M-H] <sup>-</sup> at 30V of styrylpyrones derivatives .....	154
<b>Figure 4.</b> Structure of the phenolic compounds identified by LC-MS/MS and LC-DAD in <i>E. giganteum</i> stems hydroethanolic extract .....	157
<b>Figure 5.</b> Response Surface and Contour plots of HCl molar concentration and hydrolysis time effects in quercetin and kaempferol yield .....	163

<b>Figure 6.</b> LC-UV chromatograms, at 370 nm, of the fraction containing the aglycones of <i>E. arvense</i> , <i>E. giganteum</i> , <i>E. bogotense</i> and <i>E. hyemale</i> , employing the method developed in this work for <i>E. giganteum</i> . UV spectra of quercetin, apigenin, kaempferol and unknown flavonoid .....	166
--	-----

## CAPÍTULO 5

<b>Figure 1.</b> Photomicrographs of <i>Equisetum giganteum</i> spray-dried extract and freeze-dried extract by scanning electron microscopy at 10 kV .....	180
---	-----

<b>Figure 2.</b> (A) LC-UV chromatogram at 254 nm of the spray-dried and freeze-dried extracts from <i>E. giganteum</i> ; (B) LC-ESI-MS (negative ion mode) total ion current chromatogram of the SDE .....	185
---	-----

## ANEXOS

<b>Figura A1.</b> Aspecto das cinzas totais nos cadinhos de porcelana, nos tempos 4, 8 e 12 h de incineração a 600 °C, da amostra proveniente de coleta .....	243
---	-----

<b>Figura A2.</b> CCD do extrato metanólico de <i>E. giganteum</i> e substâncias de referência: ácido caféico, ácido clorogênico e rutina .....	243
---	-----

<b>Figura A3.</b> Caules vegetativos e reprodutivos de <i>Equisetum arvense</i> L., <i>Equisetum hyemale</i> L. e <i>Equisetum bogotense</i> H. B. K. ....	244
--	-----

<b>Figura A4.</b> Aparência geral de <i>E. giganteum</i> e <i>E. bogotense</i> .....	245
--	-----

<b>Figura A5.</b> Distribuição dos locais de coleta já relatados para <i>E. giganteum</i> , <i>E. arvense</i> , <i>E. hyemale</i> e <i>E. bogotense</i> .....	246
---	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AU – unidades de absorvância

cap. – cápsula

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCD – cromatografia em camada delgada

CIM – concentração inibitória mínima

CI<sub>50</sub> – concentração inibitória 50%

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CLAE-EM/EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas com análise de espectrometria de massas sequencial no espaço

CLAE-UV – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

D – isômero óptico dextrógiro

DPPH<sup>\*</sup> – radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

FM – fase móvel

GF<sub>254</sub> – placa contendo sulfato de cálcio e indicador fluorescente com comprimento de onda de excitação de 254 nm

g% – porcentagem em relação à massa

HCl – ácido clorídrico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência ( abreviação do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

i.p. – via de administração intraperitoneal

kHz – kiloHertz

LC-MS/MS – o mesmo que CLAE-EM/EM

LDL – lipoproteína de baixa densidade (abreviação do inglês *Low Density Lipoprotein*)

LPS – lipopolissacarídeo

MeOH – metanol

m/m – relação massa / massa

m/v – relação massa / volume

NAPO – Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas

OMS – Organização Mundial de Saúde

p. ou pág. – página

PVDF – membrana filtrante de fluoreto de polivinilideno

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

REUNI – Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das  
Universidades Federais

Rf – fator de retenção (do inglês *retention factor*)

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm – rotações por minuto

RS – estado do Rio Grande do Sul, Brasil

SPE – extração em fase sólida (do inglês *solid-phase extraction*)

spp. – espécies do gênero

subg. – subgênero

SUS – Sistema único de Saúde

TFA – ácido trifluoroacético (abreviação do inglês *trifluoroacetic acid*)

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

UV – ultravioleta

UV<sub>máx.</sub> – comprimento de onda com máximos de absorbância no ultravioleta

v/v – relação volume / volume

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização e avaliação de parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal de *Equisetum giganteum* L., com posterior desenvolvimento de extrato seco obtido por *spray drying*, a fim de obter um produto adequado para posterior avaliação de atividades biológicas.

Com o intuito de organizar a exposição do tema e facilitar sua compreensão, o trabalho foi dividido em cinco capítulos resumidamente descritos a seguir:

Capítulo 1 – revisão da literatura, cuja finalidade é contextualizar o tema do trabalho e a espécie de interesse, evidenciando a relevância do tema;

Capítulo 2 – caracterização e avaliação de parâmetros de controle de qualidade para a matéria-prima vegetal. Capítulo apresentado na forma de publicação: “Physicochemical characterization for quality control of *Equisetum giganteum* L.”;

Capítulo 3 – análise qualitativa de *E. giganteum*, com avaliações comparativas a outras espécies de interesse no gênero, bem como a realização de alguns ensaios que direcionam o desenvolvimento do trabalho;

Capítulo 4 – caracterização dos compostos fenólicos presentes em *E. giganteum*; desenvolvimento e validação de método analítico empregando CLAE, útil no controle de qualidade da matéria-prima vegetal; comparação com o método analítico presente na Farmacopéia Britânica para *E. arvense*; e caracterização das agliconas de flavonóides, obtidas após processo de hidrólise das espécies de interesse. Capítulo apresentado na forma de manuscrito, visando sua submissão a periódico especializado;

Capítulo 5 – elaboração de extrato seco por *spray drying* a partir de decocto de *E. giganteum* e sua caracterização física e química. Capítulo apresentado na forma de manuscrito, visando sua submissão a periódico especializado.

Ao final, os resultados obtidos são discutidos de forma integral e as conclusões gerais do trabalho apresentadas.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	31
OBJETIVOS .....	37
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO DO TEMA .....</b>	<b>41</b>
1 O GÊNERO <i>Equisetum</i> .....	43
2 <i>Equisetum giganteum</i> L. E OUTRAS ESPÉCIES DE INTERESSE NO GÊNERO .....	45
<b>2.1 Aspectos botânicos .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Constituintes químicos .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3 Empregos na medicina popular/tradicional .....</b>	<b>51</b>
<b>2.4 Atividades biológicas .....</b>	<b>57</b>
2.4.1 Atividades gerais .....	57
2.4.2 Atividade antimicrobiana .....	58
2.4.3 Atividade hipoglicêmica .....	59
2.4.4 Atividade diurética .....	60
<b>2.5 Relação entre composição e atividade biológica .....</b>	<b>61</b>
<b>2.6 Estudos toxicológicos .....</b>	<b>65</b>
<b>2.7 Produtos medicinais e alimentícios contendo <i>Equisetum</i> spp. ....</b>	<b>67</b>
<b>2.8 Análises cromatográficas e espectrofotométricas .....</b>	<b>70</b>
3 CONTROLE DE QUALIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA VEGETAL .....	71
4 DESENVOLVIMENTO DE EXTRATOS SECOS .....	74
<b>CAPÍTULO 2 – Publicação: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION FOR QUALITY CONTROL OF <i>Equisetum giganteum</i> L. ....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 3 – ANÁLISE QUÍMICA QUALITATIVA DE <i>E. giganteum</i> E OUTRAS ESPÉCIES DE INTERESSE .....</b>	<b>87</b>
1 INTRODUÇÃO .....	89

2 PARTE EXPERIMENTAL .....	91
2.1 Solventes e reagentes .....	91
2.2 Material vegetal .....	91
2.3 Avaliação de presença de alcalóides em <i>Equisetum</i> spp. ....	93
2.4 Avaliação de presença de alcalóides em extratos de <i>E. giganteum</i> ..	94
2.5 Avaliação de presença de tiamina em <i>Equisetum</i> spp. ....	95
2.6 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de <i>Equisetum</i> spp. empregando cromatografia em camada delgada (CCD) .....	96
2.7 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de <i>Equisetum</i> spp. empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	97
2.7.1 Método A .....	97
2.7.2 Método B .....	98
2.8 Avaliação preliminar por CLAE dos processos extrativos em <i>E.</i> <i>giganteum</i> .....	100
2.9 Atividade capturadora de radicais livres: ensaio de autografia em CCD .....	101
2.10 Procedimentos para tratamento dos resíduos .....	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	102
3.1 Avaliação de presença de alcalóides em <i>Equisetum</i> spp. ....	102
3.2 Avaliação de presença de alcalóides em extratos de <i>E. giganteum</i> ..	103
3.3 Avaliação de presença de tiamina em <i>Equisetum</i> spp. ....	106
3.4 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de <i>Equisetum</i> spp. empregando cromatografia em camada delgada (CCD) .....	108
3.5 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de <i>Equisetum</i> spp. empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	113
3.6 Avaliação preliminar por CLAE dos processos extrativos em <i>E.</i> <i>giganteum</i> .....	126
3.7 Atividade Capturadora de Radicais Livres .....	131
4 CONCLUSÕES .....	133

<b>CAPÍTULO 4 – Manuscrito: CHARACTERIZATION OF COMMON AND RARE PHENOLICS PRESENTS IN <i>Equisetum giganteum</i> BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) AND A NEW APPROACH OF TOTAL FLAVONOID SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY IN HORSETAIL (<i>Equisetum</i> spp.) .....</b>	<b>135</b>
<b>CAPÍTULO 5 – Manuscrito - <i>Equisetum giganteum</i> L.: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF SPRAY-DRIED POWDER .....</b>	<b>171</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>193</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>211</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>217</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>241</b>









Plantas medicinais e seus derivados são empregados em muitos países, desenvolvidos e em desenvolvimento, como remédios caseiros, fitoterápicos ou matérias-primas para a indústria farmacêutica, representando uma proporção substancial do mercado global de medicamentos (WHO, 1998). Segundo Gurib-Fakim (2006), grande parte da população mundial depende de plantas medicinais e seus derivados para suprir suas necessidades diárias relacionadas à saúde. Além disso, estes produtos formam a base de muitos sistemas medicinais tradicionais, entre os quais está a Medicina Tradicional Ayurvédica, Chinesa e Sul Americana.

Em 2010, o Brasil inventariou sua biodiversidade resultando um total de 40.982 espécies, sendo 3.608 de fungos, 3.495 de algas, 1.521 de briófitas, 1.176 de pteridófitas, 26 de gimnospermas e 31.156 de angiospermas (FORZZA *et al.*, 2011). Apesar da grande diversidade, apenas um número restrito destas espécies foram investigadas do ponto de vista químico e farmacológico. Estas pesquisas são incipientes frente ao amplo uso de plantas medicinais decorrente da rica variedade étnica e cultural, a qual é detentora de valiosos conhecimentos tradicionais. Este fato ressalta a importância da pesquisa com plantas brasileiras e mostra a grande potencialidade nacional, ainda pouco explorada, no fornecimento de matérias-primas para a indústria farmacêutica e no desenvolvimento de novos medicamentos (BRASIL, 2006; GOTTLIEB, BORIN, 1997).

No Brasil, estima-se que somente 30% da população utilize medicamentos convencionais, 30% utilizem fitoterápicos e o restante não tenha acesso ao sistema nacional de saúde (CAÑIGUERAL *et al.*, 2003). Mesmo assim, em 2006, o mercado brasileiro de fitoterápicos faturou cerca de R\$ 543 milhões, o que corresponde a 2,51% do mercado de medicamentos, com mais de 31 milhões de unidades farmacêuticas vendidas. Mudanças importantes ocorreram neste mercado nos últimos anos, com o fechamento de diversos laboratórios de pequeno porte e a retirada de vários produtos pela dificuldade de alguns laboratórios em se adaptar à legislação que, desde o ano 2000, tem inserido novas exigências de controle de qualidade. Ao contrário dos medicamentos alopáticos, os fitoterápicos não têm controle legal de preços, estimulando a entrada neste segmento de grandes empresas multinacionais, que tendem a dominar o setor. Houve também a concentração do mercado em produtos derivados de poucas plantas, em consequência da maior facilidade de registro para monodrogas e plantas exóticas, que possuem validação com base em estudos internacionais (DE FREITAS, 2007).

Um grande passo no desenvolvimento da Fitoterapia no Brasil foi a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Esta política estabeleceu diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações, pelos diversos órgãos envolvidos na cadeia produtiva, em torno de objetivos comuns: (i) garantia de acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos; (ii) desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento da cadeia produtiva; (iii) uso sustentável da biodiversidade, e; (iv) desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. Desta maneira, seria possível ampliar as opções terapêuticas à população com garantia de acesso a plantas medicinais e fitoterápicos de qualidade, com sustentabilidade.

Outro marco importante foi a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renusus), a qual traz uma lista de espécies com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, priorizando a inclusão de plantas nativas que possam ser cultivadas, em pelo menos, uma das regiões do país, e que possam tratar as doenças de maior incidência no Brasil. O objetivo deste documento foi orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de novos fitoterápicos a serem utilizados na Assistência Farmacêutica básica (BRASIL, 2009, 2010b), bem como a normatização dos parâmetros de controle de qualidade pelos códigos oficiais (formulários e farmacopéias).

Tendo em vista que os estudos sobre composição química e avaliação de atividades biológicas que validem a utilização de uma variedade de insumos vegetais são relativamente escassos, os estudos de parâmetros de qualidade de matérias-primas vegetais, para que seja assegurada a produção de fitoterápicos com qualidade, são ainda mais raros. Assim, a caracterização química e o desenvolvimento de metodologias confiáveis que permitam a quantificação de marcadores; o desenvolvimento de extratos padronizados; e a realização de ensaios biológicos que comprovem a atividade devem ser realizados visando garantir a qualidade das drogas vegetais, seu uso seguro e sua provável utilização no desenvolvimento de novos fitomedicamentos (ICH, 2003; SCOPEL, 2005).

Neste contexto, a espécie *Equisetum giganteum* L., representa um exemplo de planta de amplo uso medicinal tradicional, tanto no Brasil como em toda a América Latina, que apresenta escassas informações sobre sua composição química, controle de qualidade e atividades biológicas, não estando descrita em códigos oficiais. Também conhecida como cavalinha e rabo-de-cavalo, essa planta

nativa do Brasil, é tradicionalmente utilizada como diurética, hemostática, entre outras atividades (LORENZI, MATOS, 2008). Algumas destas propriedades são semelhantes àsquelas indicadas para a *E. arvense* L., nativa da Europa, igualmente conhecida como cavalinha (“*horsetail*”), e comercializada como fitoterápico em muitos países. *E. arvense* tem seu uso aprovado pela Comissão E Alemã no tratamento de edemas, infecções/inflamações do trato urinário inferior e cálculos renais (BLUMENTHAL *et al.*, 2000), possui monografia em várias farmacopéias, entre elas as Farmacopéias Espanhola (FARMACOPEIA ESPANHOLA, 2002), Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005) e Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011), e apresenta vários estudos químicos e biológicos envolvendo seus extratos.

A droga vegetal e os extratos de *E. giganteum* fazem parte de numerosas preparações e medicamentos fitoterápicos na Argentina, sendo algumas vezes utilizada em substituição a *E. arvense* (AQUILA *et al.*, 2006; STOLIAR, 2009). Acredita-se que este fato também ocorra no Brasil, uma vez que algumas amostras comercializadas como *E. arvense* em Porto Alegre/RS, possivelmente tratavam-se de *E. giganteum* (A. T. HENRIQUES, comunicação pessoal, 06 nov. 2007). O comércio da droga vegetal rasurada, muitas vezes denominada apenas como *Equisetum* ou “cavalinha”, é comum no Brasil, sendo disponibilizada por fornecedores de insumos farmacêuticos e facilmente encontrada em farmácias, mercados e ervanários.

Com base nos problemas de identificação botânica, agravados pela comercialização do material na forma de rasura, e na freqüente substituição entre as espécies, torna-se necessário estabelecer critérios químicos que permitam diferenciar as espécies *E. arvense* e *E. giganteum*.

Dessa maneira, justifica-se a escolha de *E. giganteum* como tema de investigações químicas, bem como na elaboração de extratos padronizados para posteriores avaliações farmacológicas e clínicas, objetivando o desenvolvimento de um medicamento eficaz e seguro (LORENZI, MATOS, 2008).



**OBJETIVOS**

---





## 1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal de *Equisetum giganteum* L., bem como, identificar seus principais metabólitos secundários e desenvolver extrato seco por *spray drying*, a partir de solução extrativa aquosa.

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros de controle de qualidade e caracterizar a droga vegetal;
- realizar análise química da droga vegetal empregando cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), comparando os perfis qualitativo e quantitativo da espécie com os de outras espécies do gênero *Equisetum*.
- caracterizar os metabólitos secundários presentes na planta utilizando espectrometria de massas;
- preparar solução extrativa aquosa por decocção da droga vegetal;
- desenvolver extrato seco por *spray drying*, empregando equipamento semi-industrial;
- avaliar as características físicas, químicas e tecnológicas do extrato seco obtido.



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DO TEMA**

---



## 1 O GÊNERO *Equisetum*

O gênero *Equisetum*, popularmente conhecido como “cavalinha, rabo-de-cavalo, *cola-de-caballo*, *horsetail*”, é o único gênero pertencente à família Equisetaceae, Pteridophyta. Possui 15 espécies com distribuição cosmopolita, exceto na Austrália, Nova Zelândia e Antártida. Possui dois subgêneros: *Equisetum* e *Hippochaete*, que se diferenciam pela localização dos estômatos, a presença de dimorfismo e a quantidade de ramos. Todas as espécies de *Equisetum* podem ser encontradas em regiões temperadas e tropicais (MILDE, 1872; NÓBREGA, 2007; WRIGHT *et al.*, 2007), crescendo em ambientes terrestres, pantanosos ou aquáticos, ao longo de córregos e rios, margens de lagos e pântanos, entre outros, até uma altitude de 4200 m (TRYON, TRYON, 1982).

Já segundo Milde (1872), o gênero apresenta 25 espécies, das quais, 9 são nativas da América Latina e 6 podem ser encontradas no Brasil (*E. bogotense*, *E. xylochaetum*, *E. martii*, *E. giganteum*, *E. pyramidale* e *E. ramosissimum*), estando o restante distribuído, principalmente, pela América no Norte, Europa e Ásia. O gênero parece estar ausente na Bacia Amazônica e no Nordeste do Brasil (TRYON, TRYON, 1982). Entretanto, *E. hyemale* é um exemplo de espécie exótica, amplamente distribuída e cultivada no Brasil com finalidades ornamentais (Anexo, Figura A5).

A Tabela 1.1 apresenta a distribuição das espécies nos dois subgêneros do gênero *Equisetum*. As duas referências utilizadas na elaboração desta tabela (HAUKE, 1963 *apud* PIGOTT, 2011; MILDE, 1872), também descrevem a presença de híbridos nos dois subgêneros, os quais não foram apresentados. Ainda segundo os sítios publicados na internet, Tropicos.org (2012a) e The International Plant Names Index (2012), existe um grande número de nomes científicos para as espécies do gênero *Equisetum*, considerando inclusive os híbridos e variedades, muitos deles apresentados como sinonímias.

O gênero é caracterizado por plantas terrestres que podem chegar até 8 m de altura; apresenta na parte mais externa do caule ereto, cilíndrico e oco, grande quantidade de sílica; as folhas são diminutas e formam uma bainha ao redor dos nós

do caule; os estróbilos estão presentes na parte apical dos caules ou ramos; e a reprodução se dá principalmente através da dispersão de esporos (STOLZE, 1983).

Em relação ao cultivo de *Equisetum*, Rodriguez e col. (1994), demonstraram que é possível obter um grande número de plantas clonais de *E. bogotense* em um curto período de tempo (aproximadamente, 2-3 semanas), empregando a micropropagação.

**Tabela 1.1** Distribuição das espécies do gênero *Equisetum* nos subgêneros *Equisetum* e *Hippochaete*.

<b>Subgênero <i>Equisetum</i></b>	<b>Subgênero <i>Hippochaete</i></b>
<i>Equisetum arvense</i> L. <sup>1,2</sup>	<i>Equisetum giganteum</i> L. <sup>1,2</sup>
<i>E. bogotense</i> H.B.K. <sup>1,2</sup>	<i>E. hyemale</i> L. <sup>1,2</sup>
<i>E. diffusum</i> Don. <sup>1,2</sup>	<i>E. myriochaetum</i> Cham. Et Schlich. <sup>1,2</sup>
<i>E. palustre</i> L. <sup>1,2</sup>	<i>E. laevigatum</i> A. Br. <sup>1,2</sup>
<i>E. pratense</i> Ehrh. <sup>1,2</sup>	<i>E. ramosissimum</i> Desf. <sup>1,2</sup>
<i>E. silvaticum</i> L. <sup>1,2</sup>	<i>E. scirpoides</i> Michx. <sup>1,2</sup>
<i>E. telmateia</i> Ehrh. <sup>1,2</sup>	<i>E. variegatum</i> Schleich. <sup>1,2</sup>
<i>E. fluviatile</i> L. <sup>1</sup>	<i>E. xylochaetum</i> Mett. <sup>2</sup>
<i>E. limosum</i> L. <sup>2</sup>	<i>E. martii</i> Milde. <sup>2</sup>
<i>E. litorale</i> Kühlew. <sup>2</sup>	<i>E. pyramidale</i> Goldm. <sup>2</sup>
Presença de híbridos <sup>1,2</sup>	<i>E. schaffneri</i> Milde. <sup>2</sup>
	<i>E. sieboldi</i> Milde. <sup>2</sup>
	<i>E. debile</i> Roxb. <sup>2</sup>
	<i>E. mexicanum</i> Milde. <sup>2</sup>
	<i>E. robustum</i> A. Br. <sup>2</sup>
	<i>E. trachyodon</i> A. Br. <sup>2</sup>
	Presença de híbridos <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> HAUKE, 1963 *apud* PIGOTT, 2011

<sup>2</sup> MILDE, 1872

Embora o gênero *Equisetum* possa ser facilmente distinguido de todas as outras plantas, os problemas de delimitação das espécies dentro do próprio gênero

são grandes. Entre os poucos caracteres de diagnóstico disponíveis, a maioria deles são microscópicos e tornam-se difíceis de serem avaliados devido à extensa hibridação. Desta maneira, uma análise superficial pode, muitas vezes, resultar numa identificação incorreta, o que torna a diferenciação botânica do gênero problemática. Um exemplo disso é que, em diversos herbários da Guatemala, amostras de *Equisetum* estão incorretamente identificadas como *E. giganteum* (STOLZE, 1983). A identificação se torna ainda mais difícil se o material estiver rasurado ou pulverizado (PEÑA *et al.*, 1987).

Outro problema na identificação das espécies são as chaves taxonômicas disponíveis, as quais geralmente avaliam poucos caracteres e/ou trazem apenas a diferenciação entre algumas poucas espécies (MILDE, 1872; SEHNEM, 1984; STOLZE, 1983; TRYON, TRYON, 1982).

Frente a esta dificuldade, técnicas modernas e diferenciadas vêm sendo empregadas na identificação e classificação das espécies e subgêneros de *Equisetum*. Entre elas podemos destacar a análise genética pela técnica de reação em cadeia da polimerase (em inglês “Polymerase Chain Reaction” - PCR), obtendo-se assim um “*fingerprint*” dos ácidos desoxi-ribonucleico (ADN) de cada espécie (BRUNE *et al.*, 2008), análise de ADN de cloroplastos (GUILLON, 2004) e o uso de microscópio eletrônico de varredura (PAGE, 1972; PEÑA *et al.*, 1987), sendo que o maior destaque sempre é dado ao subgênero *Equisetum*, do qual *E. giganteum* não faz parte.

## 2 *Equisetum giganteum* L. E OUTRAS ESPÉCIES DE INTERESSE NO GÊNERO

### 2.1 Aspectos botânicos

*E. giganteum* L. (Figura 1; Anexo, Figura A4), subgênero *Hippochaete*, é nativa das Américas Central e do Sul, sendo encontrada em ambientes quentes e úmidos, nas florestas, matas ou em campos abertos. É um subarbusto ereto, perene, rizomatoso, com haste de cor verde, oca e monopodial, de textura áspera ao tato pela presença de silício em sua epiderme. Caracteriza-se pelos ramos em verticilos regulares, perpendiculares a ascendentes, que partem dos nós; por apresentar

estróbilos apicais mucronados nas extremidades dos ramos; podendo chegar até 5 m de altura. Multiplica-se tanto por rizomas como por esporos (LORENZI, MATOS, 2008; NÓBREGA, 2007; STOLZE, 1983; WRIGHT *et al.*, 2007).

No Brasil, *E. giganteum* é considerada nativa, podendo ser encontrada nos domínios fitogeográficos Cerrado e Mata Atlântica, distribuídos pelas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (SALINO, ALMEIDA, 2012). Costuma ser utilizada para fins ornamentais devido ao seu fácil cultivo e está, em certas regiões do Brasil, entre as piores invasoras dos campos de cultura e pastagens (GIULIETTI *et al.*, 2005).



**Figura 1.1** *Equisetum giganteum* L.: partes aéreas estéreis (A) e partes aéreas no período reprodutivo (B) de exemplares adultos, e; aspecto geral de um exemplar jovem (C).



Entre os nomes populares de *E. giganteum* podemos citar: cavalinha, cavalinha-gigante, cola-de-cavalo, erva-canudo, milho-de-cobra, rabo-de-cavalo, rabo-de-raposa, rabo-de-cobra, lixa-vegetal, rabo-de-rato, erva-carnuda, cana-de-jacaré, cauda-equina, cauda-de-raposa (LORENZI, MATOS, 2008).

Segundo a organização TROPICOS.ORG (2012b), *Equisetum giganteum* L. apresenta como sinónimas *Equisetum bolivianum* Gand., *Equisetum martii* Milde, *Equisetum pyramidale* Goldm., *Equisetum ramosissimum* Desf., *Equisetum ramosissimum* Kunth, *Equisetum schaffneri* Milde e *Equisetum xylochaetum* Mett.. Porém, como podemos verificar na Tabela 1.1, algumas de suas sinónimas são classificadas como espécies diferentes, o que corrobora com os problemas de identificação botânica. Caracterização morfo-histológica mais detalhada de *E. giganteum* já foi descrita por Jorge e col. (1999), Stolze (1983) e Peña e col. (1987).

*E. hyemale* L., subgênero *Hippochaete*, pode ser encontrada em ambientes úmidos, nas águas rasas de córregos, encostas úmidas, prados úmidos e bosques. Esta espécie apresenta caules normalmente não ramificados, 0,2-2 m de altura e 2-8 mm de diâmetro, bainhas circundadas de marrom escuro ou preto (pelo menos em caules maduros) e estróbilo proeminentemente apiculado (STOLZE, 1983) (Anexo, Figura A3). Atualmente está distribuída em diferentes continentes, entre eles Europa, Ásia e América, sendo muito empregada na jardinagem e paisagismo. Esta espécie é cultivada no Brasil, tanto para fins ornamentais, como para uso medicinal, sendo também encontrada em ambientes silvestres no Rio Grande do Sul.

Já *Equisetum arvense* L., subgênero *Equisetum*, é uma planta herbácea vivaz, nativa do hemisfério norte: Europa, Norte da África, Ásia e América do Norte, sendo encontrada em solos argilo-silicosos, úmidos e sombrios (CUNHA, 2003; MILDE, 1872). Caracterização morfo-histológica mais detalhada para *E. arvense* pode ser encontrada na Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011). Esta espécie, diferentemente de *E. giganteum* e *E. hyemale*, caracteriza-se pela presença de dois tipos de caules: (i) caules férteis que aparecem no início da primavera, geralmente grossos e suculentos, marrom a esbranquiçado, 10-30 cm de altura e, (ii) caules estéreis apresentando verticilos que saem dos nós, 10-50 cm de altura, fino, verde, e que murcham quando aparecem os caules férteis (SANDHU *et al.*, 2010a) (Anexo, Figura A3).

## 2.2 Constituintes químicos

Há poucos estudos quanto à constituição química das partes aéreas de *E. giganteum*. Pesquisas com a espécie, empregando métodos de prospecção fitoquímica, sem a identificação dos constituintes, indicam a presença de alcalóides, saponinas e flavonóides, como flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavanóis, (DANIELSKI *et al.*, 2007). Outro trabalho também relata a presença de flavonóides (ANDRADE-CETTO, HEINRICH, 2005), enquanto Moraes (2011) relata os grupos de metabólitos secundários: flavonóides, cumarinas, taninos e saponinas. Para o extrato metanólico desta espécie, glicosídeos flavonoídicos são relatados (BARBOSA *et al.*, 2005).

Utilizando-se técnicas com melhor desempenho analítico (CG-EM), foram encontrados na oleoresina de *E. giganteum*, extraída por fluído supercrítico, alcanos, como o *n*-heneicosano, ácidos graxos, como o ácido dodecanóico, metil ésteres, como o metil éster do ácido 3-noninóico e triterpenos esteroidais, como o ergosta-4,7,22-trien-3-ona e gorgost-5-en-3-ol (MICHIELIN *et al.*, 2005).

Na determinação de compostos inorgânicos nas partes aéreas secas de *E. giganteum* foram encontradas altas quantidades de cinzas totais (24,93%), sílica (20,03%) e potássio (6,44%), assim como lítio, sódio, ferro, zinco e prata, além de outros minerais. Estes valores foram semelhantes àqueles encontrados em *E. bogotense* (OVALLES *et al.*, 1996). Teores de 20% de sílica também foram relatados para *E. telmateia* (HARRISON, 1996).

O gênero *Equisetum* é caracterizado pelo elevado teor de sílica em sua constituição (até 25% de massa seca). Neste gênero, a sílica, indispensável para o crescimento e suporte mecânico do vegetal, fica depositada na sua parede celular epidérmica, fortemente associada a polímeros e proteínas. Estas biomoléculas contendo sílica não são facilmente extraídas pelas técnicas e solventes convencionais (por ex. etanol diluído), mas podem ser extraídas com agentes complexantes e soluções fortemente alcalinas (CURRIE, PERRY, 2009; GIERLINGER *et al.*, 2008; HARRISON, 1996). Em estudo avaliando a otimização das condições de extração de silício em *E. arvense*, pôde-se obter um extrato com concentração de 0,19% (m/m) de silício, após 30 min. de agitação sob decocção da

droga com água destilada à 90 °C (1:20, droga:solvente, m/m), e 0,61% após 3 h de extração (1:100, droga:solvente, m/m) (PIEKOS, PASLAWASKA, 1975). Para *E. hyemale*, é possível extrair 2,7 µg/mL de compostos solúveis contendo silício quando se emprega extração com água sob ebulição (1:100, droga:solvente, m/m) (NIPPON ZOKI, 1999).

Com relação aos metabólitos secundários, ácidos fenólicos e flavonóides são os compostos mais relatados para espécies de *Equisetum*, principalmente flavonóis heterosídicos (derivados do canferol e quercetina) e flavonas heterosídicos (derivados da luteolina, apigenina e genkwanina). Outro composto que aparece com freqüência no gênero, principalmente nos gametófitos, é a equisetumpirona, um estilpirona heterosídica (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b; WIEDENFELD *et al.*, 2000; PARK, TOMOHIKO, 2011). Outros compostos, como carotenóides, também já foram encontrados em algumas espécies (CZECZUGA, 1985).

Em *E. bogotense*, apenas dois flavonóides, canferol-3-O-soforosídeo e canferol-3-O-soforosídeo-7-O-glicosídeo, o ácido 5-O-cafeoil-chiquímico e a equisetumpirona foram encontrados. Enquanto em *E. arvense* podem ser observados pelo menos 28 flavonóides (principalmente quercetina-3-O-(6"-O-malonilglicosídeo) e apigenina-5-O-glicosídeo) e 4 ácidos fenólicos (principalmente ácido dicafeoil-meso-tartárico), além de equisetumpirona. *E. arvense*, por possuir um perfil de compostos fenólico mais complexo que outras espécies do gênero, é uma planta que apresenta grande variação química intraespecífica. Além disso, dois quimiotipos podem ser observados, quanto à presença ou ausência de flavonas glicosídicas derivadas da luteolina (VEIT *et al.*, 1995b).

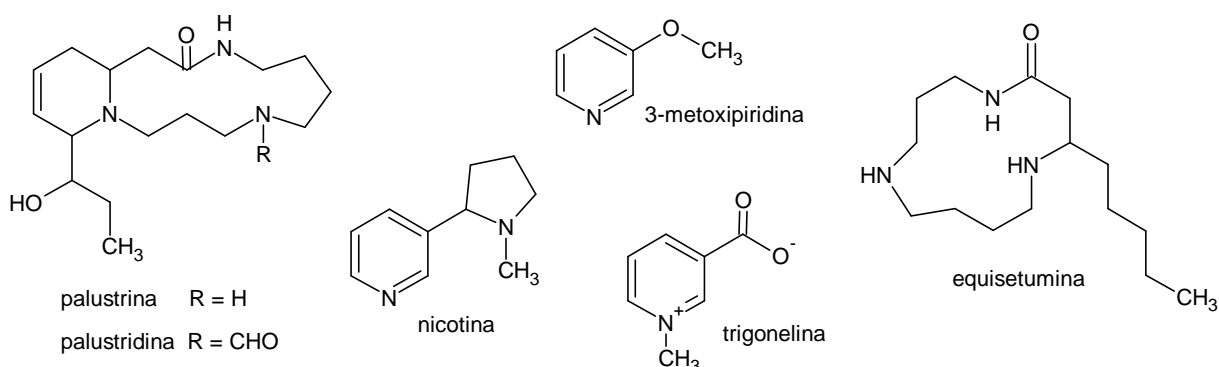
*E. arvense*, espécie com maior número de estudos sistemáticos no gênero, apresenta na constituição de suas partes aéreas cerca de 10% de sais minerais (silícicos: 5 a 8%, potássicos: 2,1 a 2,9%, e baixo teor de magnésicos); flavonóides glicosilados; taninos; 5% do saponosídeo equisetonina; vestígios de alcalóides (equispermina, palustrina); vitamina C; ácidos fenólicos; manitol; inositol (CUNHA, 2003) e 3,16% de carotenóides (CZECZUGA, 1985). A Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011) estabelece um teor mínimo de 0,3% de flavonóides totais e de 12 a 27% de cinzas totais para a droga vegetal desta espécie. Os grupos de metabólitos relatados em extratos de *E. arvense* são:

alcalóides, carboidratos, proteínas e amino ácidos, fitoesteróis, saponinas, flavonóides e triterpenóides (SANDHU *et al.*, 2010b). Veit e colaboradores (1995a, 1995b), em trabalho envolvendo a caracterização de um grande número de constituintes utilizando CLAE-UV, relataram diversos ácidos fenólicos e heterosídeos da quercetina e do canferol, como também algumas flavonas heterosídicas no extrato metanólico desta espécie. Dados quantitativos mais precisos por CLAE apontaram para um extrato aquoso seco padronizado de *E. arvense*, um conteúdo de 0,61% (m/m) de derivados heterosídicos da quercetina; 0,35% de derivados heterosídicos do canferol; 1,77% de ésteres do ácido caféico; e 0,66% de ácido dicafeoil-meso-tartárico (GRAEFE, VEIT, 1999).

Estudos fitoquímicos indicam a presença de flavonóides e alcalóides em *E. hyemale* (ANDRADE-CETTO, HEINRICH, 2005). Alguns derivados glicosídicos de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis já foram isolados e identificados (PARK, TOMOHIKO, 2011), bem como alguns carotenóides, estes últimos na concentração de 3,8 mg/g (CZECZUGA, 1985).

Entre os alcalóides e compostos nitrogenados relatados para *Equisetum* spp. temos a palustrina, alcalóide com elevada toxicidade, isolado e identificado apenas em *E. palustre* (KARRER, EUGSTER, 1948). Para esta espécie são ainda relatados os alcalóides palustridina e nicotina (GURBUZ *et al.*, 2009). 3-Metoxipiridina (MANSKE, MARION, 1942 *apud* HUNT, McKILLOP, 1964), traços de nicotina (WICHTL, 1994; BLUMENTHAL *et al.*, 2000) e de derivados da espermidina (WICHTL, 1994) podem ser encontrados em *E. arvense*. A trigonelina, uma N-metil betaína, já foi relatada em *E. telmateia* (BLUNDEN *et al.*, 2009). Para *E. telmateia* ainda foram relatados a presença de indol-3-carbaldeído e do composto nitrogenado palmitamida, os quais podem ser artefatos, enquanto nicotina e palustrina não puderam ser detectadas (BOURDOUX *et al.*, 1971). Um novo alcalóide, denominado equisetumina (2-pentil-1,5,9-triazaciclotridecan-4-ona), foi relatado para *E. debile* (TAN *et al.*, 2011). Outros derivados lipídicos da betaína (composto nitrogenado) também são relatados para algumas espécies de *Equisetum* (ROZENTSVET *et al.*, 2000). Segundo Hegnauer (1988), na classe Equisetopsida, a nicotina (traços a pequenas quantidades) parece ser amplamente difundida entre as espécies, os alcalóides palustrina e palustridina podem ser encontrados em *E. palustre*, e em

outras espécies, derivados da espermidina podem ser esperados. A estrutura dos principais alcalóides relatados para o gênero podem ser visualizadas na Figura 1.2.



**Figura 1.2** Estrutura dos principais alcalóides relatados para o gênero *Equisetum*.

O gênero apresenta baixas quantidades de óleo volátil. O rendimento de óleo essencial obtido por hidrodestilação a partir das partes aéreas de *E. arvense* foi de 0,01% (m/m), sendo constituído principalmente por dinorsesquiterpenóides, monoterpenóides e dinorditerpenóides (RADULOVIĆ *et al.*, 2006).

Em *E. ramosissimum*, foi relatada a presença de tiaminases tipo 1 e 2, enzimas associadas a toxicidade de *Equisetum* spp., bem como um teor de 0,1 µg/g de tiamina (vitamina B1) (MEYER, 1989).

### 2.3 Empregos na medicina popular/tradicional

Espécies do gênero *Equisetum* são utilizadas para fins medicinais em vários países do mundo, principalmente sob a forma de infusão e decocto das partes aéreas, sendo empregados como diuréticos, hemostáticos, no tratamento de doenças renais, pulmonares e diabetes (ANDRADE CETTO, HEINRICH, 2005; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 2007).

Popularmente, infusões e decoctos das partes aéreas de *E. giganteum* são utilizadas para fins medicinais em toda a América Latina, já que a planta é nativa

dessa região. Na Tabela 1.2 podemos verificar os principais usos populares relatados para esta espécie, sendo grande parte proveniente de estudos etnobotânicos. No Brasil, a planta faz parte de numerosas preparações empregadas como emagrecedoras.

**Tabela 1.2** Usos populares/tradicionais, com finalidades medicinais, relatados para as partes aéreas de *E. giganteum*.

<b>Localidade</b>	<b>Indicações de uso / Ações terapêuticas</b>	<b>Referência</b>
Argentina	diurética e hemostática	LEAL <i>et al.</i> , 1999
Argentina	diurética, hepatoprotetora, colagoga, antidiarreica, em transtornos urinários, em resfriados, na gonorréia e para úlceras e feridas como adstringente (uso externo)	GORZALCZANY <i>et al.</i> , 1999
Argentina - região noroeste	afecções urinárias e hepáticas	HILGERT, 2001
Argentina - região noroeste	diurética e adstringente	QUIROGA <i>et al.</i> , 2001
Argentina - região noroeste do Chaco	diurética e na prevenção de doenças hepáticas	SCARPA, 2004
Argentina - região norte	utilizada para “urinar, menstruação, facilitar a digestão, limpar a pele, para os rins e fígado”	MARINOFF <i>et al.</i> , 2006
Argentina - região oeste	tratamento de transtornos hepáticos	SCARPA, 2002
Argentina - região central	diurética, contra afecções hepáticas, renais e esplênicas	GOLENIOWSKI <i>et al.</i> , 2006
Argentina - Berisso	antinefrítica e diurética	HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2009
Argentina - noroeste da Patagônia	tratamento de doenças urinárias	ESTOMBA <i>et al.</i> , 2006
Argentina - Santiago del Estero	diurética, emenagoga	CARRIZO <i>et al.</i> , 2002
Bolívia	tratamento de doenças hepáticas	ABDEL-MALEK <i>et al.</i> , 1996
Bolívia - Chaco	tratamento da falta de apetite, cansaço e doenças renais (dor e inflamação)	BOURDY <i>et al.</i> , 2004

Bolívia - Cochabamba	tratamento de cistite e febre, depurativo renal, pedras nos rins, dores menstruais e digestivo	CEUTERICK <i>et al.</i> , 2011
Bolívia - La Paz e El Alto	diurética e “inchaço no rim”	MACÍA <i>et al.</i> , 2005
Colombianos em Londres	no tratamento de cistite	CEUTERICK <i>et al.</i> , 2008
Equador - região sul	diurética, problemas renais e dor de estômago	TENE <i>et al.</i> , 2007
Guatemala	tratamento tópico de doenças mucocutâneas: abscessos, furúnculos, dermatites, irritação, feridas, úlceras, infecções do trato urinário, etc.	CÁCERES <i>et al.</i> , 1987a
Guatemala	diurética, hipotensora e no tratamento de doenças renais/cistite/nefrose	CÁCERES <i>et al.</i> , 1987b
México	diurética e adstringente, no tratamento de cálculos renais	PÉREZ GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 1985
México	tratamento de doenças gastrointestinais	ROBLES-ZEPEDA <i>et al.</i> , 2011
Paraguai	tratamento de doenças de pele	PORTILLO <i>et al.</i> , 2001
Peru	sedativa para as cólicas, em associação com <i>Gynoxys sp.</i> e <i>Cynodon dactylon</i>	DE FEO, 2003
Peru - região norte	uso externo: vulnerário (tratamento de feridas), depurativo da pele, anti-infeccioso e anti-hemorragico. Uso interno: cálculos biliares e renais, diurético e febres da malária (febre terçã)	DE FEO, 1992
Peru - Distrito de Callería	tratamento de doenças provavelmente associadas a microrganismos	KLOUCEK <i>et al.</i> , 2005
Peru - Lima	depurativo renal, próstata, depurativo, anti-inflamatórios	CEUTERICK <i>et al.</i> , 2011
Peru - região de Nor-Yauyos	uso interno: diurético, hemostático e anti-inflamatórios para aliviar a prostatite, inflamação da bexiga e cálculos renais. Uso tópico: emoliente, antisséptico, anti-inflamatório e para cicatrizar lesões infecciosas, hemorragias nasais e feridas infecciosas. Também é usado na neoplasia	REHECHO <i>et al.</i> , 2011
Venezuela	tratamento de doenças renais e por suas propriedades adstringentes, depurativas, diaforéticas, diuréticas, emenagoga, hemostática e remineralizante.	OVALLES <i>et al.</i> , 1996

Brasil - índios Guarani, local não especificado	abortiva, emenagoga	NOELLI, 1998
Brasil - Jupi, PE	tratamento de “problemas oftalmológicos e hemorroidais”	TEIXEIRA, MIRANDA DE MELO, 2006
Brasil - Campo Grande, MS	“rins, fígado, bexiga, infecções renais, na bexiga e olhos e depurativo do sangue”	NUNES <i>et al.</i> , 2003
Brasil - Índios Xokleng da Terra Indígena Ibirama, SC	tratamento de “males dos rins e bexiga”	SENS, 2002
Brasil - Porto Alegre, RS	“depurativo do sangue, diabete, para urinar, prosta (próstata), purifica o sangue e reumatismo”	VENDRUSCOLO <i>et al.</i> , 2005; VENDRUSCOLO, MENTZ, 2006
Brasil - Porto Alegre, RS	“para perder peso”	DICKEL <i>et al.</i> , 2007
Brasil - RS	no reumatismo, conjuntivite, úlcera, diabete, problemas do sangue e doenças do estômago e dos rins	SIMÕES <i>et al.</i> , 1990 <i>apud</i> VENDRUSCOLO <i>et al.</i> , 2005
Brasil, Argentina e Uruguai	adstringente, diurética, anti-hemorrágica, antidisentérica e antigonorréica	VENDRUSCOLO <i>et al.</i> , 2005
não especificada	“diurético, hemostático e adstringente, sendo também apropriado no tratamento da diarréia, gonorréia e cálculos renais, revitalização de unhas e cabelos sem vida, entre outras aplicações”	DANIELSKI <i>et al.</i> , 2007
não especificada	“na forma de chá como adstringente, diurética e estíptica, sendo empregada também para o tratamento da gonorréia, diarréias e infecções de rins e bexiga e, na forma de tintura em uso interno e externo, para estimular a consolidação de fraturas ósseas	PANIZZA, 1998 <i>apud</i> LORENZI, MATOS, 2008

\* No Brasil, devido ao seu difundido uso como diurética, *E. giganteum* é amplamente empregada, na forma de monodroga ou em associações, com finalidades emagrecedoras (A. T. HENRIQUES, comunicação pessoal, 06 nov. 2007).



*E. arvense* é utilizada popularmente para fins medicinais, principalmente, como diurética. Seu uso também se dá na convalescença; como antiaterogênica, reconstituente e remineralizante; na consolidação de fraturas, na osteoporose, nas doenças reumáticas; infecções genito-urinárias e prevenção da litíase urinária; obesidade acompanhada de retenção de líquidos; menorragia, anemias; externamente em ulcerações dérmicas, da córnea, inflamações orofaríngeas e dermatites (CUNHA, 2003), e ainda como agente antipirético, antitussígeno e antiinflamatório (NAGAI *et al.*, 2005). Sandhu e colaboradores (2010a) relatam que, na medicina tradicional, *E. arvense* é usada “para tuberculose, como catártico dos rins e bexiga, como hemostático na menstruação abundante, hemorragias nasais, pulmonares e gástricas, para unhas quebradiças e perda de cabelo, para doenças reumáticas, gota, má cicatrização de feridas e úlceras, inchaço, fraturas e queimaduras”. Seus usos aprovados pela Comissão E Alemã (BLUMENTHAL *et al.*, 2000) são: internamente, em edema pós-traumático e estático (diurético), na terapêutica de irrigação para doenças bacterianas e inflamatórias do trato urinário baixo e no cálculo renal; externamente, no tratamento de apoio de feridas de difícil cicatrização, não sendo conhecidas contra-indicações, nem efeitos adversos.

A substituição de *E. arvense* por outras espécies é comum, no Brasil, as duas espécies mais encontradas e comercializadas, grande parte em substituição a *E. arvense*, são *E. giganteum* e *E. hyemale*. Já na Argentina, podemos destacar *E. bogotense* e *E. giganteum*.

*E. hyemale* é utilizada, popularmente, no tratamento de inflamações, diarreia e dores renais (STOLZE, 1983) e, como decocto, no tratamento de doenças hepáticas (KIM, SONG, 2011) e no “alívio da incapacidade de urinar em homens mais velhos” (RITCH-KRC *et al.*, 1996). *E. myriochaetum*, na forma de infuso, é empregado no tratamento de distúrbios renais (STOLZE, 1983).

Andrade-Cetto e Heinrich (2005) citam que espécies de *Equisetum*, principalmente *E. hyemale*, *E. laevigatum* e *E. myriochaetum*, são vendidas indistintamente em mercados no México, sendo tradicionalmente utilizadas no tratamento de doenças renais, sendo esta última também empregada no tratamento do diabetes. Pérez Gutiérrez e col. (1985) citam que *E. fluviatile*, *E. hyemale* var. *affine* e *E. myriochaetum*, além de *E. giganteum*, são utilizadas desde os tempos

pré-colombianos como diuréticas e adstringentes, no tratamento de cálculos renais e para polir utensílios de cobre.

Hilgert (2001), em estudo etnobotânico no noroeste da Argentina, relata que as espécies nativas *E. giganteum* e *E. bogotense*, embora diferentes no tamanho, são utilizadas por terem as mesmas propriedades no tratamento de alterações hepáticas e urinárias, sendo inclusive intercambiáveis. Outro trabalho etnobotânico realizado no Peru também relata o intercâmbio destas duas espécies no tratamento de doenças de pele e problemas renais, bem como diurético (DE FEO, 1992). Estomba e col. (2006) relatam o emprego tradicional, no noroeste da Patagônia Argentina, destas duas espécies nativas no tratamento de doenças urinárias, sendo ainda relatado para *E. bogotense* sua utilização como analgésica e antiinflamatória. No Equador, a infusão aquosa de *E. bogotense* é utilizada popularmente como antiparasitária, diurética e no tratamento de problemas renais (TENE *et al.*, 2007). No Peru, o infuso das partes aéreas e raízes desta espécie é utilizado oralmente como antiinflamatório e, misturada com folhas de *Desmodium mollicum*, é utilizado no tratamento do câncer de próstata (HAMMOND *et al.*, 1998). Molares e Ladio (2009) relatam que *E. bogotense* é utilizada pela comunidade indígena Mapuche, do sul do Chile e Argentina, no tratamento de desordens genito-urinárias, bem como diurética e adstringente (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

Os usos medicinais de *E. arvense*, bem como de outras espécies do gênero, tem sido amplamente baseados na tradicionalidade e não em investigações científicas. Há evidências preliminares do uso de *Equisetum* em humanos comprovando seu efeito diurético (LEMUS *et al.*, 1996), hipoglicêmico (REVILLA *et al.*, 2002), no aumento da densidade óssea na osteoporose (CORLETTO, 1999), no tratamento da distrofia ungueal em pacientes portadores de psoríase (CANTORES *et al.*, 2009) e no tratamento da hiperplasia prostática benigna (TAMAKI *et al.*, 2008). Estes dados demonstram a necessidade da realização de estudos complementares para avaliar a segurança e confirmar a eficácia do uso de *Equisetum* spp..

## 2.4 Atividades biológicas

### 2.4.1 Atividades gerais

É relatada atividade potencializadora do fator de crescimento neural (NGF) para o extrato de acetato de etila das partes aéreas de *E. giganteum* (LI *et al.*, 1999); atividade tripanocida, *in vitro*, frente tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentrações de 250-500 mg/mL do extrato metanólico desta espécie (ABE *et al.*, 2005); além de atividade hipocolesterolêmica e hipotrigliceridêmica, via oral, em coelhos diabéticos induzido por aloxano, para o extrato butanólico de *E. giganteum* na dose 3,5 mg/kg (VIEIRA *et al.*, 2006). Em ensaio *in vitro* prospectivo avaliando atividade anti-HIV, verificou-se índices terapêuticos (IT) acima de 8 para extratos aquosos de *E. giganteum* [ IT = concentração tóxica (< 95% de viabilidade) / concentração antiviral (concentração onde 50% das células são protegidas do efeito citopático do HIV) ]. Dado curioso foi que para amostras de *E. giganteum* que apresentavam crescimento superficial de fungos filamentosos (possivelmente por não terem sido armazenadas secas), houve um aumento significativo no IT. Além disso, houve reprodutibilidade na atividade de amostras de *E. giganteum* obtidas em diferentes anos e locais de coleta, demonstrando pouca variação química na espécie (ABDEL-MALEK *et al.*, 1996).

Foram ainda encontradas duas patentes relacionadas à espécie *E. giganteum*: na primeira, a espécie, entre outras do gênero, aparece fazendo parte de um chá composto indicado no tratamento de hemorróidas (MON'S TEA PARTNERSHIP, 1999), na segunda, o extrato desta planta é utilizado como inibidor da tirosinase em produtos cosméticos (SHISEIDO, 1997).

Para o extrato hidroetanólico de *E. arvense* é relatada atividade antinociceptiva e antiinflamatória em camundongos, nas doses de até 100 mg/kg, i.p. (DO MONTE *et al.*, 2004), além de efeitos sedativos e anticonvulsivantes em ratos, nas concentrações de 200 e 400 mg/kg, i.p. (DOS SANTOS JR. *et al.*, 2005). Para uma fração acetato de etila obtida a partir de extrato metanólico de *E. arvense*, é relatada atividade hepatoprotetora em citotoxicidade tacrina-induzida em células de hepatoma humano, na concentração de 400 µg/mL (OH *et al.*, 2004). Diferentes frações do extrato hidro-metanólico de *E. arvense* apresentaram atividade

antiproliferativa, *in vitro*, frente a células tumorais humanas HeLa e HT-29, em concentrações entre 0,125 e 1 mg/mL, com valores de  $CI_{50}$  entre 0,23 e 0,76 mg/mL (ČETOJEVIĆ-SIMIN *et al.*, 2010). O infuso de *E. arvense* ainda apresenta atividade inibidora da agregação plaquetária induzida por trombina (*in vitro*), com  $CI_{50}$  de  $6,75 \pm 0,65$  mg/mL (MEKHFI *et al.*, 2004).

Para o extrato hidroetanólico de *E. palustre* é relatada atividade anti-ulcerogênica, avaliada oralmente em ratos com lesões gástricas etanol-induzidas (GURBUZ *et al.*, 2009).

Para o extrato metanólico de *E. hyemale* é relatada atividade inibitória da produção de óxido nítrico em macrófagos LPS-ativados, com 50,1% de inibição na concentração de 80  $\mu$ g/mL (RYU *et al.*, 2003).

Já o extrato hidroetanólico de *E. bogotense* apresenta atividade inibitória da enzima  $\beta$ -glicuronidase ( $CI_{50}$  de 6,4  $\mu$ g/mL, *in vitro*) e atividade hipotensora em ratos normotensos (administração endovenosa de 5 mg/kg), não apresentando atividade inibitória da enzima xantina oxidase ( $CI_{50} > 50$   $\mu$ g/mL) em ensaio *in vitro* (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1992).

#### 2.4.2 Atividade antimicrobiana

Diversos trabalhos demonstram que espécies de *Equisetum* não apresentam atividade antimicrobiana pronunciada *in vitro*, com exceção do óleo volátil de *E. arvense*, que apresentou pronunciada atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *A. niger*, *C. albicans* e *E. coli*, com atividade semelhante aos antibióticos convencionais ampicilina e hiclato de doxiciclina (RADULOVIĆ *et al.*, 2006).

Para o extrato hidroetanólico de *E. giganteum*, as concentrações inibitórias mínimas (CIM), frente diferentes cepas de bactérias Gram-positivas e negativas foram, em grande parte, superiores a 8 mg/mL, sendo que, para algumas bactérias Gram-negativas, não foram observadas inibições em concentrações de 16 mg/mL (KLOUCEK *et al.*, 2005). Portillo e col. (2001), utilizando o método de difusão em disco, não verificaram atividade antifúngica para extratos aquoso, diclorometano e

metanólico de *E. giganteum* frente diferentes cepas fúngicas, em concentrações de até 10 mg/disco. Cáceres e col. (1987a), utilizando também a técnica de difusão em disco, não verificaram inibição frente isolados clínicos de *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* produzidas pela tintura (1:10) de *E. giganteum*. Outros trabalhos também relatam fraca a moderada atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro*, para extratos desta espécie (ALONSO PAZ *et al.*, 1995; QUIROGA *et al.*, 2001). Resén (2002) relata a atividade fungicida do extrato de *E. giganteum* frente ao fungo fitopatogênico *Phytophthora infestans*, o qual afeta o cultivo da batata, demonstrando o potencial da espécie como fungicida no cultivo orgânico de alimentos e matérias-primas vegetais.

A concentração inibitória mínima (CIM) frente *Helicobacter pylori* obtidas em ensaios *in vitro*, foram > 1 mg/mL para o extrato aquoso e > 0,5 mg/mL para o extrato metanólico de *E. myriochaetum* (CASTILLO-JUÁREZ *et al.*, 2009). Para o extrato metanólico de *E. hyemale*, os valores de CIM só foram obtidos em concentrações acima de 20 mg/mL frente *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (NAVARRO *et al.*, 1996).

#### 2.4.3 Atividade hipoglicêmica

O extrato butanólico de *E. giganteum*, na dose 3,5 mg/kg, apresentou atividade hipoglicemiante, via oral, em coelhos diabéticos aloxano-induzidos (VIEIRA *et al.*, 2006). Extratos aquoso (7 e 13 mg/kg) e butanólico (8 e 16 mg/kg) de *E. myriochaetum* apresentaram, em ratos diabéticos estreptozotocina-induzidos, atividade hipoglicêmica semelhante a glibenclamida (3 mg/kg). Este efeito iniciou 60 minutos após a administração oral, com um máximo de efeito após 3 h (ANDRADE-CETTO *et al.*, 2000). O extrato metanólico de *E. arvense* apresentou significativa atividade hipoglicêmica e regeneração hepática em ratos diabéticos estreptozotocina-induzidos, nas doses de 50 e 250 mg/kg por via oral. Neste experimento, nenhuma alteração histopatológica no tecido hepático e no peso corporal dos animais tratados foi encontrada (SOLEIMANI *et al.*, 2007). Experimento semelhante, com o mesmo extrato de *E. arvense*, confirma esta atividade

hipoglicemiante, além de uma proteção contra a nefropatia causada pelo diabetes (SAFIYED *et al.*, 2007).

Estudo clínico, realizado com 11 pacientes portadores de diabetes tipo 2, verificou o efeito hipoglicêmico do decocto de *E. myriochaetum*. A redução nos níveis séricos de glicose iniciou 90 min após administração oral de dose única do decocto, na concentração de 0,33 g de planta/kg de peso, e manteve-se até 180 min, não sendo verificada alteração nos níveis séricos de insulina. Isto mostra que o mecanismo de ação do decocto não se deve à estimulação na secreção de insulina, como ocorre com a glibenclamida (REVILLA *et al.*, 2002), nem devido à inibição da  $\alpha$ -glicosidase, como demonstrado por Andrade-Cetto e col. (2008).

#### 2.4.4 Atividade diurética

A atividade diurética de diferentes espécies de *Equisetum* foi avaliada e comprovada (CÁCERES *et al.*, 1987b; LEMUS *et al.*, 1996; PÉREZ GUTIÉRREZ *et al.*, 1985; RODRIGUEZ *et al.*, 1994). Cáceres e col. (1987b) verificaram, durante 6 h, um aumento de 90% na diurese de ratos tratados oralmente (1 g/kg) com o decocto (1:10) de *E. giganteum*. Pérez Gutiérrez e col. (1985) avaliaram a atividade diurética em camundongos, de extratos clorofórmicos de quatro espécies de *Equisetum*: *E. fluviatile*, *E. hyemale* var. *affine*, *E. giganteum* e *E. myriochaetum*. Os extratos, administrados oralmente na dose de 50 mg/kg, apresentaram atividade diurética 2 a 6 h após a administração. Houve aumento na excreção urinária de sódio, cloro e potássio, como também elevação no pH urinário, mecanismo semelhante ao da hidroclorotiazida. *E. hyemale* foi a espécie que apresentou atividade mais pronunciada, seguida de *E. fluviatile*, *E. giganteum* e finalmente *E. myriochaetum*. O extrato de *E. hyemale* var. *affine* apresentou atividade semelhante e/ou superior aos fármacos de escolha, hidroclorotiazida, espironolactona e furosemida, nas doses de 25 mg/kg. O terceiro estudo (RODRIGUEZ *et al.*, 1994), avaliou a atividade diurética e hipotensora de extratos de *E. bogotense* em ratos. Neste trabalho, o extrato hidroetanólico desta espécie apresentou atividade hipotensora após administração intravenosa de 5 mg de extrato por kg de peso corporal, e atividade diurética após administração oral, em dose única, de 500 mg/kg. Estudo clínico, realizado com

voluntários sadios, indicou efeito diurético do infuso de *E. bogotense* com significativo aumento na excreção de sódio, potássio e cloro, com ausência de efeitos adversos, após administração oral do infuso em dose equivalente a 0,75 g de planta, por dois dias consecutivos (LEMUS *et al.*, 1996).

Foi encontrado também um ensaio *in vitro* avaliando o efeito de extratos de *E. ramosissimum*, usado tradicionalmente como diurético e antihipertensivo, sobre a enzima conversora da angiotensina (ACE) que desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e diurese. Os extratos foram considerados inativos (inibição < 50%) na concentração de 0,33 mg/mL, não sendo este, possivelmente, o mecanismo do alegado efeito diurético e anti-hipertensivo da planta (ADSERSEN; ADSERSEN, 1997).

Estes estudos comprovam a atividade diurética e hipoglicêmica de algumas espécies de *Equisetum*, sugerindo inclusive seu emprego terapêutico. Mesmo assim, estudos pré-clínicos e clínicos adicionais devem ser realizados para melhor avaliar a segurança e eficácia, a fim de subsidiar o desenvolvimento de um produto fitoterápico (REVILLA *et al.*, 2002; WRIGHT *et al.*, 2007).

## **2.5 Relação entre composição e atividade biológica**

Para as partes aéreas de *E. arvense*, sabe-se que, devido à grande quantidade de sais de silício, esta planta apresenta propriedades remineralizantes e tonificantes do tecido conjuntivo, melhorando a consistência e elasticidade dos tecidos de suporte e revestimento. Este elemento contribui, ainda, para um aumento das defesas imunitárias. Os taninos conferem propriedades adstringentes e cicatrizantes, úteis em situações de diarreia, hemorragias e feridas. Já a ação diurética é associada aos flavonóides e aos sais de potássio (CUNHA, 2003). Nesta espécie, os compostos responsáveis pela atividade hepatoprotetora *in vitro* de uma fração extraída com acetato de etila foram isolados e identificados como onitina e luteolina (OH *et al.*, 2004). Quanto à atividade inibidora da agregação plaquetária do infuso de *E. arvense*, esta foi relacionada aos polifenóis presentes (MEKHFI *et al.*, 2004).

Em relação à atividade diurética de *Equisetum* spp., esta poderia ser atribuída aos elevados teores de potássio (OVALLES *et al.*, 1996), bem como à outros compostos presentes no gênero, como ácidos fenólicos e derivados heterosídicos de flavonóides (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b). Os elevados teores de potássio podem contribuir para o efeito diurético apresentado por espécies deste gênero, já que este mineral apresenta reconhecida atividade diurética e anti-hipertensiva *in vivo* (PATKI *et al.*, 1990; YOUNG *et al.*, 1976), mas não seria o único responsável pela atividade, já que extratos clorofórmicos de algumas espécies de *Equisetum* apresentaram atividade diurética pronunciada *in vivo*. Considerando a extração com clorofórmio e o rendimento de 1,0% obtido em resíduo seco, espera-se uma pequena quantidade de minerais e potássio neste extrato, devendo a atividade estar, portanto, relacionada aos metabólitos secundários presentes (PÉREZ GUTIÉRREZ *et al.*, 1985).

Sabe-se que o uso prolongado ou doses elevadas de grande parte dos diuréticos sintéticos, atualmente em emprego clínico, podem apresentar como efeitos adversos: aumento excessivo na eliminação renal de potássio, podendo causar uma hipocalemia; alteração no metabolismo de lipídeos com aumento do colesterol total e LDL; e aumento nos carboidratos séricos (hiperglicemia) e intolerância à glicose com aumento do risco de diabetes (MORALES-OLIVAS, 2008). Embora os estudos sejam preliminares, nenhum destes efeitos adversos foi relatado durante o uso de derivados de *Equisetum*. Desta maneira, mostra-se promissor avaliar o uso concomitante de derivados de *Equisetum* com diuréticos sintéticos, com o intuito de reduzir a dose destes últimos e/ou minimizar alguns de seus efeitos adversos.

Alguns flavonóides, relatados para o gênero (VEIT *et al.*, 1995b), também poderiam contribuir para a atividade diurética. Atividade diurética e antihipertensiva *in vivo* já foram comprovadas para uma mistura de flavonóides glicosilados obtidos de *Spergularia purpurea* (JOUAD *et al.*, 2001). Neste trabalho, após administração oral da mistura de flavonóides (5 mg/kg por 1 semana) em ratos, verificou-se uma redução na pressão sanguínea, como também um efeito diurético com aumento da filtração glomerular e excreção de sódio, potássio e cloro. Estes efeitos foram mais pronunciados em ratos hipertensos que nos normotensos, não havendo alteração nos batimentos cardíacos de ambos os grupos. Estes mecanismos e efeitos foram



semelhantes àqueles apresentados por algumas espécies de *Equisetum* (PÉREZ GUTIÉRREZ *et al.*, 1985).

Segundo Rodriguez e col. (1994), o efeito hipotensor provocado pela administração intravenosa, em ratos, de extrato hidroetanólico de *E. bogotense* pode ser atribuído aos compostos de maior polaridade presentes no extrato, possivelmente compostos fenólicos. Atividade vaso-relaxante em aorta de ratos já foi comprovada para o ácido dicafeoil-meso-tartárico isolado de *E. arvense* (SAKURAI *et al.*, 2003).

Em relação à atividade hipoglicêmica *in vivo* demonstrada por extratos de *E. myriochaetum*, sabe-se que os principais constituintes presentes são três heterosídeos do canferol (canferol-3-O-soforosídeo, canferol-3,7-di-O- $\beta$ -glicosídeo, canferol-3-O-soforosídeo-4'-O- $\beta$ -glicosídeo) e um derivado heterosídico do ácido caféico (cafeoilmetilato-4- $\beta$ -glicopiranosídeo), e destes, o canferol-3-O-soforosídeo-4'-O- $\beta$ -D-glicosídeo é indicado como o principal responsável pela atividade apresentada (ANDRADE-CETTO *et al.*, 2000). Existem relatos de atividade hipoglicêmica *in vivo* de extratos vegetais contendo derivados do canferol, como por exemplo, canferol-3-O-galactosídeo e canferol-3-ramno-glicosídeo de *Bauhinia variegata* (ANDRADE-CETTO, 1999 *apud* ANDRADE-CETTO *et al.*, 2000), canferol-3-O- $\beta$ -rutinosídeo de *Bauhinia candicans* (FUENTES *et al.*, 2004), e canferol-3,7-di-O- $\alpha$ -ramnopiranosil (canferitrina) de *Bauhinia forficata* (MENEZES *et al.*, 2007). Estes trabalhos demonstram que a atividade hipoglicêmica de *Bauhinia* está diretamente relacionada aos derivados heterosídicos do canferol e/ou quercetina. Jorge e col. (2004) citam que entre os flavonóides na forma de aglicona e heterosídica encontrados nas folhas de *B. forficata*, a canferitrina foi o único composto que apresentou efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos, e por isso foi estudado mais detalhadamente.

Atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* também já foi relatada para o flavonol heterosídico rutina (KAMALAKKANNAN, PRINCE, 2006), para outros flavonóides na forma heterosídica e aglicona (AHMED *et al.*, 2010; RAUTER *et al.*, 2010) e para o ácido caféico (JUNG *et al.*, 2006). Kamalakkannan e Prince (2006) verificaram a atividade anti-hiperglicêmica e antioxidante da rutina após administração oral em ratos diabéticos estreptozotocina-induzidos; doses de 25 a 100 mg de rutina/kg

foram administradas durante 45 dias. Neste ensaio, verificou-se uma relação entre a atividade antioxidante da rutina com sua atividade anti-hiperglicêmica, já que seus efeitos na captação de radicais livres e inibição da lipoperoxidação podem prevenir o estresse oxidativo e proteger as células  $\beta$ -pancreáticas, resultando em aumento da secreção de insulina e diminuição dos níveis de glicose sanguínea. No tratamento de ratos normais com rutina, nenhuma alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados pôde ser observada. Em ensaio utilizando ratos diabéticos (tipo 2) nicotinamida-estreptozotocina-induzidos, uma dose de 50 mg/kg/dia foi administrada oralmente durante 30 dias. Ao final do experimento, pode-se verificar o efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperlipidêmico da rutina, bem como seu mecanismo de ação (AHMED *et al.*, 2010).

O composto responsável pela atividade anti-ulcerogênica *in vivo* do extrato hidroetanólico de *E. palustre* foi identificado como sendo o canferol-3-O-1''- $\beta$ -D-glucopiranosil-3-O-1''- $\beta$ -D-glucopiranosídeo. Quando este composto foi avaliado isoladamente apresentou 69,5 e 98,5% de inibição de úlcera, nas doses de 250 e 500 mg/kg, respectivamente (GURBUZ *et al.*, 2009).

Desta maneira, pode-se esperar que os flavonóides presentes em *Equisetum* possam contribuir ou até mesmo serem os responsáveis pelas atividades diurética e hipoglicêmica/anti-hiperglicêmica relatadas. Sabe-se que alguns destes flavonóides apresentam também uma significativa atividade antioxidante (OH *et al.*, 2004), a qual pode estar relacionada a algumas das atividades biológicas anteriormente relatadas.

O silício, presente em grande quantidade no gênero *Equisetum* e amplamente distribuído nos tecidos animais (pele, cabelo, ossos, pulmão, pâncreas, baço, etc.) faz parte de biocompostos que, além de regularem a ação imunológica e autonômica das células nervosas, possuem a capacidade de regular o sistema caliceína-cinina. A regulação deste sistema pode auxiliar no tratamento de síndromes alérgicas, dor, estresse e doenças inflamatórias (NIPPON ZOKI, 1999).

Para o ácido silicílico, presente em grande quantidade em *E. giganteum*, é relatada atividade fungicida frente ao fitopatógeno *Phytophthora infestans*. O extrato desta planta, aplicado foliarmente, penetraria na epiderme do vegetal, aumentando a resistência aos fungos (RESÉN, 2002).

## 2.6 Estudos toxicológicos

O amplo número de trabalhos etnobotânicos, descrevendo o emprego medicinal de plantas do gênero *Equisetum* pelas comunidades nativas, desde os tempos remotos, sem relatos de efeitos adversos ou tóxicos, pode ser considerado um indicativo de ausência de toxicidade aguda destas espécies.

Revilla e col. (2002) ao avaliarem o efeito hipoglicêmico do decocto de *E. myriochaetum* em seres humanos não verificaram efeitos adversos e nem alterações na pressão sanguínea durante o ensaio. Lemus e col. (1996) também não verificaram efeitos adversos em seres humanos após a administração oral do infuso de *E. bogotense*, o qual apresentou atividade diurética.

Ensaio *in vitro* (teste do micronúcleo humano) e *in vivo* (teste da mancha em asa em *Drosophila melanogaster*) demonstraram que extratos de *E. myriochaetum* não são genotóxicos em doses de até 0,5 mg/mL (TÉLLEZ *et al.*, 2007). Na avaliação da toxicidade em *Artemia salina*, foi encontrada uma CL<sub>50</sub> de 154 µg/mL para o extrato hidroetanólico de *E. bogotense* (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1992); > 10 mg/mL para o extrato aquoso e 785 µg/mL para extrato etanólico desta mesma espécie (BUSSMANN *et al.*, 2011); e entre 5 e 10 mg/mL para o decocto de *E. giganteum*, concentração expressa como massa de planta seca por mL (GONZÁLEZ *et al.*, 1993). Neste último trabalho, o decocto de *E. giganteum* também não inibiu o crescimento de radículas de trigo.

Estudo de toxicidade de *E. giganteum in vivo*, demonstrou ausência de efeitos tóxicos em camundongos tratados oralmente, em dose única, com o infuso aquoso desta planta (equivalente a 14 g de planta seca/kg de peso corporal). Após administração, os animais foram acompanhados durante 15 dias e nenhuma alteração comportamental, neurológica, autonômica, no peso e nos órgãos vitais dos animais foi encontrada (GORZALCZANY *et al.*, 1999).

Não há relatos de toxicidade ou efeitos adversos em humanos associados ao uso de *E. giganteum*, com exceção da possibilidade de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade. Para *E. arvense*, foi encontrado um relatado de indução de dermatite seborréica em pessoas alérgicas à fumaça de tabaco (SUDAN, 1985).

Na avaliação dos efeitos hepatotóxicos após administração oral de extratos aquosos de *E. arvense* em ratos, nas doses de 30, 50 e 100 mg/kg, durante 14 dias, verificou-se que não houve alteração anatomo-patológica de tecido hepático, nem modificação significativa na atividade sérica das enzimas hepáticas (BARACHO *et al.*, 2009). Um estudo em ratos (ambos os sexos) avaliou a influência da incorporação de extrato aquoso de *E. arvense* na ração destes animais, nas doses de 0, 0,3, 1 e 3% durante 13 semanas. Ao final do experimento, nenhuma toxicidade foi detectada com referência aos sinais clínicos, peso corporal, exame de urina, dados da bioquímica hematologia e sérica e peso dos órgãos. Exame microscópico não revelou lesões histopatológicas associadas ao tratamento. Segundo relato, a dose tóxica seria > 1,79 e > 1,85 g de extrato/kg de peso corporal/dia para machos e fêmeas, respectivamente (TAGO *et al.*, 2010). Já em ensaio preliminar avaliando a toxicidade aguda de extrato hidroetanólico de *E. arvense* em ratos Wistar (200-250 g), nas doses de 1,0, 2,0 e 5,0 g/kg i.p., foi verificada uma depressão respiratória transitória e uma sedação elevada nos animais, com mortalidade de 12,5% e 37,5% nas doses de 2 e 5 g/kg i.p., respectivamente. Enquanto que nas doses até 400 mg/kg i.p., este mesmo extrato evitou a morte dos animais no teste de convulsão induzido por pentilenotetrazol (DOS SANTOS *et al.*, 2005). Os resultados deste último trabalho devem ser analisados com cautela, já que uma dose muito elevada pela via de administração intra-peritoneal foi empregada, o que não é usual.

As matérias-primas empregadas em dois destes trabalhos avaliando *E. arvense* (DOS SANTOS *et al.*, 2005; BARACHO *et al.*, 2009), foi adquirida de fornecedor Brasileiro e proveniente de coleta em Santa Catarina, respectivamente, havendo assim, uma possibilidade de o material vegetal se tratar na verdade de *E. giganteum*, espécie amplamente cultivada e comercializada no Brasil e encontrada por nosso grupo no litoral Catarinense.

Com exceção do artigo anteriormente citado, os únicos relatos de toxicidade encontrados envolvendo o gênero *Equisetum*, entre elas *E. giganteum*, estão relacionados à ingestão das partes aéreas da planta por eqüinos e bovinos, principalmente em épocas de estiagem, levando à perda de peso e alterações nervosas, podendo causar a morte destes animais. A toxicidade foi atribuída à presença de tiaminases, que levam a um quadro de deficiência de tiamina (vitamina B1) (ALVIN-CARNEIRO, 1948; AL-QURA'N, 2005; LORENZI, MATOS, 2008). Em

*E. ramosissimum*, uma alta atividade de tiaminases tipo 1 e 2, principalmente do tipo 2, foram encontradas (MEYER, 1989). Em eqüinos, grandes quantidades diárias de *Equisetum* precisam ser consumidas, por pelo menos 1 a 2 semanas, para que a intoxicação possa ocorrer (BEBBINGTON, WRIGHT, 2007).

Segundo McGuffin e col. (1997 *apud* BLUMENTHAL *et al.*, 2000) o consumo de *E. arvense* na forma de pó não é recomendado para crianças ou para o uso prolongado devido ao seu elevado conteúdo de sílica inorgânica, sendo a sua toxicidade similar à intoxicação por nicotina em crianças que mastigaram os caules. Como na medicina popular há o consumo de preparações (infusões e decoctos) obtidas a partir das partes aéreas de *Equisetum* spp., não havendo consumo da planta *in natura*, espera-se que não ocorra este tipo de intoxicação, já que a extração de sílica por estes métodos é restrita.

A palustrina, provavelmente o alcalóide mais tóxico relatado para *Equisetum* spp., foi isolado de *E. palustre*. Ao ser administrada intradermicamente em camundongos, na forma de hidrocloreto, produziu inicialmente uma excitação motora, seguida de ataxia e paralisia respiratória combinada com convulsões clônicas e contorções, sendo o óbito provocado por parada respiratória/asfixia em doses  $\geq 1$  mg. Em coelhos, 4 mg de palustrina induziu um aumento da pressão arterial. Em coração isolado de sapo, uma dose de 5 mg/mL causou uma parada diastólica, a qual foi facilmente revertida pela lavagem, sendo efeitos inotrópicos positivos observados em doses de até 0,01 mg/mL (KARRER, EUGSTER, 1948).

## **2.7 Produtos medicinais e alimentícios contendo *Equisetum* spp.**

*Equisetum* é um gênero com amplo emprego medicinal. No Brasil e Argentina, a droga vegetal ou seus extratos fazem parte de algumas preparações e medicamentos fitoterápicos, sendo que frequentemente *E. giganteum* é utilizada em substituição a espécie *E. arvense* (nativa da Europa), com as mesmas finalidades medicinais que esta, com destaque para a atividade diurética (AQUILA *et al.*, 2006; STOLIAR, 2009).

*E. arvense* está presente na Consulta Pública nº 73 de 2010, que propõe o Formulário Nacional Fitoterápico (BRASIL, 2010c). Neste documento, é estabelecida sua utilização na forma de infuso para o tratamento de edemas causados por retenção de líquidos. Outro fato importante sobre *E. arvense* é sua inclusão na lista das 71 espécies vegetais com potencial terapêutico descritas na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS - RENISUS. A finalidade desta relação é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. As plantas que constam nesta lista foram selecionadas para atender às doenças mais comuns nos brasileiros (BRASIL, 2009). Aqui podemos encontrar uma incoerência, já que *E. arvense*, apesar de ser amplamente descrita, é uma espécie exótica, que apresenta raros relatos de coleta no nosso território. Pode-se suspeitar que, pela dificuldade na identificação botânica entre as espécies do gênero *Equisetum*, poderia estar ocorrendo no Brasil, uma substituição de *E. arvense* por outras espécies nativas e cultivadas.

Muitos dos produtos existentes no mercado mencionam em seus rótulos a presença de *E. arvense*, mas conforme descrito anteriormente, a possibilidade de que se trate de *E. giganteum* não pode ser descartada, principalmente em países da América Latina, de onde *E. giganteum* é nativa, podendo ser facilmente encontrada (LORENZI, MATOS, 2008; NÓBREGA, 2007; STOLZE, 1983; WRIGHT *et al.*, 2007) (Anexo, Figura A5).

A seguir, são apresentados os produtos contendo *Equisetum* spp. com registros ativos (em janeiro de 2012) na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012):

Nome Comercial: CAVALINHA HERBARIUM

Nome da Empresa: Herbarium Laboratório Botânico Ltda

Princípio Ativo: *Equisetum arvense* L.

Categoria: Diuréticos - Fitoterápico Simples

Apresentação: Cápsulas duras. 128 mg/cap., blisters contendo 30, 45 ou 60 cápsulas

Nome Comercial: CAVALINHA EC

Nome da Empresa: As Ervas Curam Ind Ftca Ltda

Princípio Ativo: *Equisetum arvense* L.

Categoria: Diureticos - Fitoterápico Simples

Apresentação: Tintura. Frasco de 100 mL

Indicações: A CAVALINHA EC atua como um diurético e antiinflamatório suave das vias urinárias.

Nome Comercial: LYMPHOMYOSOT

Nome da Empresa: Heel do Brasil Biomédica Ltda

Princípio Ativo: *Myosotis arvensis*, *Veronica officinalis*, *Teucrium scorodonia*, *Pinus sylvestris*, *Gentiana lutea*, *Equisetum hyemale*, *Smilax officinalis*, *Scrophularia nodosa*, *Juglans regia* L., *Calcium phosphoricum*, *Natrum sulfuricum*, *Fumaria officinalis* L., *Levothyroxinum*, *Araneus diadematus*, *Geranium robertianum*, *Nasturtium officinale* R.Br., *Ferrum iodatum*

Categoria: Associação Homeopática

Apresentação: Comprimido sub-lingual: frasco contendo 50 comprimidos. Solução oral: frasco de 30 mL

Outros seis produtos com registros vencidos até janeiro de 2012 também foram encontrados (ANVISA, 2012): um produto homeopático contendo *E. hyemale*, um fitoterápico simples contendo extrato de *E. arvense* e quatro produtos (três fitoterápicos simples e uma associação) contendo *E. arvense* L.

Além destes, muitos outros produtos não registrados na ANVISA são comercializados no Brasil na forma de comprimidos e cápsulas, grande parte produzidos por farmácias magistrais. A droga vegetal rasurada de *Equisetum* spp. também pode ser encontrada em farmácias, mercados e ervanários na forma de sachês para chá, embalagens de até 100 g e a granel. Todos estes produtos também podem ser facilmente encontrados e adquiridos pela *internet*.

Desta maneira, a importância de *E. giganteum* no mercado farmacêutico nacional e sul-americano é demonstrada pela variedade e quantidade de produtos, tanto fitoterápicos quanto suplementos e produtos alimentícios, que contêm *Equisetum* em sua formulação, como também da própria droga vegetal.

## 2.8 Análises cromatográficas e espectrofotométricas

As Farmacopéias Espanhola (FARMACOPEIA ESPANHOLA, 2002), Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005) e Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011) apresentam monografia para a droga vegetal *Equisetum arvense* (“Horsetail, Equiseti herba”). Nestas monografias, a CCD é utilizada para a identificação da matéria-prima, já o doseamento, determinado como flavonóides totais e expresso em isoquercitrosídeo, é realizado por espectrofotometria no visível (425 nm), após hidrólise ácida e complexação com cloreto de alumínio. Esta metodologia, empregada por diferentes Farmacopéias, por ser uma técnica relativamente rápida e pouco complexa, gera resultados aproximados, pois utiliza o mesmo coeficiente de absorção para diferentes agliconas, porém falha para extratos contendo C-heterosídeos e não é reprodutível para aqueles contendo diferentes proporções de flavonóis e flavonas (VEIT, 1995b). Devido a estes problemas, esta técnica está em desuso pela Farmacopéia Norte Americana. Em outras farmacopéias, como a Farmacopéia Européia, o método espectrofotométrico está gradativamente sendo substituído pelo método de doseamento por CLAE (A. T. HENRIQUES, comunicação pessoal, 09 fev. 2011).

A CLAE em fase reversa é uma técnica de amplo uso no controle de qualidade de matérias-primas vegetais, por permitir o desenvolvimento de métodos de análise qualitativa e quantitativa rápidos, seletivos e sensíveis. Mas apesar disto, em nenhuma das duas farmacopéias citadas anteriormente é relatada a análise da matéria-prima vegetal de *Equisetum* por CLAE. Esta técnica foi utilizada por Veit e colaboradores (1995a, 1995b) para análise química qualitativa e semi-quantitativa de fenólicos, em extratos metanólicos de diferentes espécies de *Equisetum* subg. *Equisetum*, entre elas *E. arvense*, empregando-se detecção no UV (detector PDA). Nestes trabalhos, é possível verificar a complexidade dos extratos metanólicos de



*E. arvense* e de outras espécies do gênero. Fica evidente a dificuldade em se diferenciar os sinais dos compostos pelo seu espectro de UV e tempo de retenção, pois há muita semelhança entre os espectros dos diferentes flavonóides heterosídicos presentes e a possibilidade de co-eluição dos compostos. Para contornar estas dificuldades, foram utilizadas substâncias de referência na caracterização dos constituintes, as quais haviam sido previamente isoladas de espécies de *Equisetum*.

Os mesmos problemas relatados na análise por CLAE-UV aparecem na análise por cromatografia em papel ou em camada delgada (CCD), onde a comparação dos Rf's e a coloração das manchas, podem conduzir a uma identificação incorreta dos compostos (VEIT, 1995b). Apesar da dificuldade na identificação dos compostos, existe a possibilidade de diferenciar as espécies de *Equisetum* pelo seu perfil cromatográfico tanto por CCD, quanto por CLAE. Wagner e Bladt (1996, pág. 226-227) e Gallo e col. (2011) apresentam perfis cromatográficos obtidos por CCD e CCD de alta eficiência, respectivamente, de algumas espécies de *Equisetum*, permitindo caracterizar a droga vegetal de *E. arvense* e diferenciá-la de outras espécies do gênero utilizadas na falsificação/substituição. Estes trabalhos demonstram que apesar de não ser simples o uso de CCD ou CLAE-UV na caracterização de espécies de *Equisetum*, estas técnicas podem ser empregadas na identificação preliminar do material vegetal, bem como na padronização e análise de extratos, importantes no controle de qualidade.

### 3 CONTROLE DE QUALIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

Atualmente, no Brasil, o uso da fitoterapia é incentivada e/ou adotada por várias organizações governamentais e não governamentais (BRASIL, 2006). Isto é reflexo, sobretudo, da importância histórica de plantas medicinais para a terapêutica (SCHENKEL *et al.*, 2003), da procura de soluções para problemas como o alto custo dos medicamentos e da busca por uma menor dependência externa. Esta dependência pode ser comprovada pela necessidade das indústrias farmacêuticas e

cosméticas brasileiras de importar grande parte de seus insumos (BUSTAMANTE, LEITE, 2006).

A produção de fitoterápicos representa uma perspectiva importante para o desenvolvimento desse setor industrial, levando-se em conta a riqueza da biodiversidade existente no país. A ampliação do consumo levou à normatização do setor com aplicação e constante revisão de normas técnicas para a produção e comercialização de medicamentos, visando garantir a segurança no uso e eficácia terapêutica aliada à qualidade do produto (DE FREITAS, 2007).

Atualmente, a transformação de matérias-primas vegetais em medicamentos requer o desenvolvimento de métodos analíticos e processos produtivos padronizados, bem como a realização de ensaios de eficácia e segurança. O segmento de fitoterápicos, impulsionado pela dificuldade de obtenção de matérias-primas adequadas e pela legislação sanitária, vem introduzindo uma nova estratégia de produção através do emprego de extratos intermediários padronizados, caracterizados por seu maior valor tecnológico agregado e pela constância de qualidade, e com indicações clinicamente comprovadas (DE FREITAS, 2007).

Entre os ensaios necessários para garantir a qualidade de uma droga vegetal encontram-se os testes de autenticidade (caracterização organoléptica, identificação macroscópica e microscópica), testes de pureza e integridade (cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, umidade/perda por dessecação, pesquisa de matérias estranhas, contaminantes microbiológicos, metais pesados e agrotóxicos), perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica e análises quantitativas dos constituintes ativos, quando conhecidos (BRASIL, 2010a; WHO, 1998). Todos esses ensaios, além de garantirem a qualidade, favorecem a elaboração e padronização de produtos derivados.

A determinação dos constituintes químicos, principalmente do marcador das espécies vegetais, é de extrema importância na definição dos parâmetros necessários na padronização de metodologias para a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e de medicamentos fitoterápicos, bem como para o planejamento e monitoramento das ações de transformações tecnológicas e estabilidade (FARIAS, 2003; FARIAS *et al.*, 1985; SONAGLIO *et al.*, 2003). Além

disso, existe a necessidade do emprego de métodos analíticos devidamente validados nas determinações qualitativas e quantitativas, desde a matéria-prima até as especialidades farmacêuticas, incluindo todas as fases do desenvolvimento do produto (BRASIL, 2003; SWARTZ, KRULL, 1998). A validação do método analítico reveste-se de especial importância por garantir o sucesso da aplicação do método, além de detectar as possibilidades de erros nos procedimentos analíticos e oferecer evidências comprovadas da sua eficiência e reprodutibilidade (CAUSON, 1997).

Os principais problemas encontrados com as matérias-primas vegetais e plantas medicinais comercializadas no Brasil são: as condições de armazenamento inadequadas, o extrativismo predatório e a falta de controle de qualidade (adulteração de drogas, a não uniformidade da composição química e as contaminações físicas e microbiológicas) (EMBRAPA, 2011; FARIAS *et al.*, 1985). Alguns trabalhos demonstram que a adulteração (substituição da parte empregada, contaminação com outras espécies ou total substituição do vegetal) é a principal causa de rejeição da qualidade de insumos vegetais e produtos fitoterápicos comercializados (NASCIMENTO *et al.*, 2005; ZUCCOLOTO *et al.*, 1999).

Entre os fatores que contribuem para a substituição total ou parcial de insumos vegetais podemos destacar a falta de práticas agrícolas adequadas e fornecedores qualificados (EMBRAPA, 2011), juntamente com o emprego de nomes vernaculares (populares), associado à dificuldade de identificação botânica correta de algumas espécies (MARTINS-DA-SILVA, 2002).

Como *E. giganteum* é amplamente comercializada e empregada com finalidades medicinais no Brasil e América Latina, sendo relatado seu uso em substituição a *E. arvense*, torna-se necessário o estabelecimento de parâmetros de qualidade para o controle da droga vegetal e posteriormente para seus derivados. Entre as espécies do gênero, a única que apresenta parâmetros estabelecidos em código oficial é *E. arvense* (FARMACOPEIA ESPANHOLA, 2002; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011).

#### 4 DESENVOLVIMENTO DE EXTRATOS SECOS

Na elaboração de um fitoterápico no estado sólido, a preparação de soluções extrativas, contendo as substâncias químicas de interesse terapêutico, constitui uma etapa preliminar que, após a retirada da água ou solvente, conduz à obtenção de um produto intermediário, geralmente, um extrato seco. Os extratos secos vegetais são produtos intermediários que apresentam vantagens de maior estabilidade química e facilidade de armazenamento, manuseio e transporte. O tipo e condições de secagem devem ser estabelecidos de acordo com a constituição química do material a secar, bem como, com as características desejadas aos produtos intermediários e acabados (LIST, SCHIMIDT, 1989; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

Em relação ao desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, os extratos secos apresentam muitas vantagens, sobretudo, quando comparados a extratos fluidos e moles. Entre as técnicas de secagem empregadas na preparação de extratos secos, se destaca a secagem por *spray-drying*. Os produtos obtidos por este tipo de secagem apresentam características bem definidas, como tamanho e forma da partícula uniformes, freqüentemente maior estabilidade química e microbiológica, melhor homogeneidade de distribuição dos constituintes, além de possuírem propriedades de reconstituição instantânea e elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos, cápsulas e granulados (BROADHEAD *et al.*, 1992; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

A preferência na utilização desta técnica de secagem na produção de fitomedicamentos deve-se, especialmente, aos baixos custos e baixos riscos de degradação dos constituintes químicos durante a operação. O curto tempo de contato entre o produto a ser seco e a fonte de calor é uma das principais vantagens da operação de secagem por aspersão quando comparada com outros métodos de secagem que empregam calor, tornando possível sua utilização na secagem de substâncias sensíveis ao calor como enzimas, vitaminas, glicosídeos, entre outras (BROADHEAD *et al.*, 1992; LIST e SCHIMIDT, 1989; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

Estas características observadas para a técnica revela seu potencial para a secagem de soluções extrativas aquosas de *E. giganteum*, com vistas na produção de extrato seco. Na secagem de soluções extrativas vegetais, a utilização de adjuvantes de secagem é freqüente (COUTO, 2000; SOARES, 2002; ZÉTOLA *et al.*, 2002; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010; PETROVICK *et al.*, 2010; YATSU *et al.*, 2011), já que as mesmas apresentam tendência de aderir às paredes da câmara de secagem, resultando em baixo rendimento. Há raros casos em que a preparação de extratos secos sem adição de adjuvantes de secagem é viável, apesar destes serem de maior interesse para a realização de ensaios de atividade biológica.



**CAPÍTULO 2**

**Publicação: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION  
FOR QUALITY CONTROL OF *Equisetum giganteum* L.**

---





**Physicochemical characterization for quality control  
of *Equisetum giganteum* L.**

Leandro N. FRANCESCATO <sup>1,\*</sup>, Dayane A. QUINTEROS <sup>1</sup>, Sérgio BORDIGNON <sup>1</sup>,  
Valquiria L. BASSANI <sup>2</sup>, Amélia T. HENRIQUES <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima*

<sup>2</sup> *Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Departamento de Produção e Controle  
de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:*

leandrofrancescato@yahoo.com.br

**SUMMARY.** This work presents physicochemical and chemical characterization of *Equisetum giganteum* L. stems, an endemic species of Latin America widely used in the traditional medicine, mainly as diuretic. The loss on drying, total ash and acid-insoluble ash values were  $11.85 \pm 0.11\%$ ,  $\geq 13.61 \pm 0.38\%$ ,  $\geq 9.43 \pm 0.35\%$ , respectively. The total phenolic and flavonoid content were  $7.27 \pm 0.05$  mg GAE/g and  $0.42 \pm 0.0141$  g%, respectively. Data on drying, adsorption and sorption isotherms and other physicochemical determinations are also presented. The thin layer chromatography and liquid chromatography profiles revealed the presence of polyphenol compounds. These results will provide important information for future studies involving the standardization and quality control of *E. giganteum* raw material and products.

**KEY-WORDS:** *Equisetum giganteum*, physicochemical characterization, fingerprint, quality control.

---

Artigo publicado no periódico **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 6, p. 1196-1201, 2011.

A publicação original está disponível em:  
<[http://www.latamjpharm.org/previous\\_issue.php?vol=30&num=6](http://www.latamjpharm.org/previous_issue.php?vol=30&num=6)>.



**CAPÍTULO 3**  
**ANÁLISE QUÍMICA QUALITATIVA DE**  
***E. giganteum* E OUTRAS ESPÉCIES DE INTERESSE**

---



## 1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais produzem diferentes grupos de metabólitos secundários (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) em diferentes proporções, dependendo da sua característica genética e dos fatores edafo-climáticos. Desta maneira, a constância de concentrações de metabólitos secundários nas matérias-primas vegetais é difícil de ser observada, especialmente considerando a influência adicional dos fatores extrínsecos ao vegetal, como condições de coleta, estabilização e estocagem. A variabilidade nos teores destes constituintes pode ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente na segurança e eficácia de produtos fitoterápicos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; KLEIN *et al.*, 2009).

A avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos de origem vegetal pode apresentar problemas relacionados à insuficiência de dados químicos sobre muitas matérias-primas vegetais, bem como o desconhecimento das substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas. Atualmente, também se considera que em muitos extratos, a atividade é exercida pelo conjunto de substâncias presentes. Além disso, os freqüentes casos de adulterações e falsificações de matérias-primas vegetais, e a dificuldade na identificação botânica de algumas espécies podem dificultar a obtenção de produtos fitoterápicos seguros e eficazes.

Desta maneira, levando-se em consideração que algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, podendo servir como parâmetro de controle de qualidade (qualitativos e quantitativos) e contribuir para a sua identificação, existe a necessidade da realização de uma análise química detalhada para as plantas destinadas ao uso terapêutico.

A avaliação de parâmetros químicos qualitativos e quantitativos para matérias-primas vegetais pode ser realizada por diferentes métodos, como, por exemplo, a cromatografia. A cromatografia em camada delgada (CCD) permite analisar rápida e preliminarmente a composição e a pureza do material estudado, auxiliando na identificação de problemas como a adulteração ou identificação equivocada da espécie vegetal de interesse. Esta técnica simples, barata e rápida, fornece resultados satisfatórios e permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo. No entanto, apesar de estar descrita em muitas monografias farmacopéicas e

ser amplamente empregada, esta metodologia é considerada apenas para ensaios de caracterização, sendo indispensável o emprego de técnicas mais sensíveis como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), entre outras.

A CLAE em fase reversa é uma técnica de amplo uso pelas indústrias farmacêuticas de fitoterápicos no controle de qualidade de matérias-primas vegetais e seus derivados. Ela permite o desenvolvimento de métodos de análise qualitativa e quantitativa rápidos, seletivos e sensíveis. Entretanto, grandes são as dificuldades encontradas no controle da qualidade destes materiais, principalmente por parte de empresas de pequeno porte, onde a cromatografia em camada delgada e a espectrofotometria ainda são as principais ferramentas de análise.

Para *E. arvense*, a análise por CCD ainda é empregada na identificação da matéria-prima vegetal e na avaliação da presença de adulterantes (FARMACOPEIA ESPANHOLA, 2002; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011). Wagner e Bladt (1996, p. 226-227), ao fazer análise química comparativa entre algumas espécies europeias de *Equisetum*, empregam a CCD para obter um perfil cromatográfico característico de cada amostra, destacando a presença ou ausência de alguns deles para a caracterização das amostras. Já Veit e col. (1995a, 1995b) empregaram a CLAE-UV na avaliação química qualitativa e semi-quantitativa de fenólicos de diferentes espécies de *Equisetum* subg. *Equisetum*. Nestes trabalhos, fica evidente a importância do perfil cromatográfico obtido tanto por CCD quanto por CLAE na caracterização e diferenciação das amostras e conseqüentemente no seu controle de qualidade. Os metabólitos secundários avaliados nestes trabalhos são, principalmente, os flavonóides e ácidos fenólicos. Além dos compostos fenólicos, alcalóides parecem estar presentes em espécies do gênero, e também tem sido indicados na diferenciação das espécies (WAGNER, BLADT, 1996, p. 226-227).

Assim, este capítulo teve por objetivo realizar análise qualitativa de *E. giganteum*, comparando-a com outras espécies do gênero, empregando para isto cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, a fim de obter dados que permitam diferenciar *E. giganteum* das outras espécies.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados, quando não especificado, foram procedentes das empresas FMaia, Nuclear, Quimex, Synth ou Vetec, apresentando grau de pureza pró-análise. Água destilada foi utilizada nos procedimentos de cromatografia em camada delgada, experimentos em geral e na preparação de reagentes.

Nas análises por CLAE foram empregados solventes com alto grau de pureza, como água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), acetonitrila e metanol (grau HPLC, Tedia Company, OH, USA), ácido fórmico (96%, grau CLAE, Tedia Company, OH, EUA) e ácido trifluoroacético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Nas cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Alemanha) de espessura de 0,2 mm, com suporte de alumínio.

As substâncias de referência empregadas foram nicotina (isolada de adesivos repositores de nicotina), cloridrato de tiamina (Sigma Aldrich, St. Louis/EUA), rutina hexa-hidratada (Sigma Aldrich, St. Louis/EUA), isoquercitrina ( $\geq 97\%$ , Fluka, Buchs/Suíça), ácido clorogênico e ácido caféico (Chromadex, Irvine/EUA).

### 2.2 Material vegetal

Partes aéreas de *E. giganteum* foram coletadas em março de 2008 e outubro de 2009, em Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul (S 29° 52.475', W 50° 23.830', 0 m). A autenticidade do material vegetal proveniente da primeira coleta foi avaliada pela Botânica Rosana Senna, e uma exsicata foi depositada no herbário HAS (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil), sob o número 47302.

O material rasurado seco proveniente das partes aéreas de *E. giganteum* e de outras espécies de *Equisetum* também foram adquiridas no comércio (em Farmácias e Supermercados), armazenadas em embalagens plásticas contendo 25 a 50 g de

material seco rasurado), de empresas fornecedoras de matéria-prima vegetal (em embalagens de 1 ou 2 kg) ou foram cedidas pela professora Silvia Debenedetti, da Universidad de Belgrano, Buenos Aires/Argentina. Cápsulas contendo o pó das partes aéreas de *E. arvense*, produzida por Laboratório de Medicamentos Francês, juntamente com a matéria-prima rasurada desta espécie, foram adquiridas em Barcelona, Espanha. Parte do material vegetal rasurado foi identificado pelo Prof. Dr. Paulo Günter Windisch e Maria Angélica Rubio, ambos do Departamento de Botânica da UFRGS, e pela prof. Etile D. Spegazzini da Universidad Nacional de La Plata (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Listagem das amostras de *Equisetum* utilizadas neste trabalho

Amostra nº	Tipo	Origem	Nome/Espécie segundo rótulo	Data de envase/coleta	Espécie identificada
1	coleta	Santo Antonio da Patrulha/RS	-	03/2008	<i>E. giganteum</i>
2	coleta	Santo Antonio da Patrulha/RS	-	10/2009	<i>E. giganteum</i>
3	comercial	Brasil	<i>Equisetum</i> sp.	06/2007	n.i.*
4	comercial	Brasil	<i>E. arvense</i> L.	11/2007	n.i.
5	comercial	Brasil	<i>E. hyemale</i>	12/2007	n.i.
6	comercial	Brasil	<i>Equisetum</i> sp.	11/2007	n.i.
7	matéria-prima	Brasil	<i>E. arvense</i> L.	12/2007	n.i.
8	matéria-prima	Brasil	<i>Equisetum</i> spp.	04/2008	n.i.
9	comercial	Madrid/Espanha	Cola Caballo	02/2009	n.i.
10	coleta	Bariloche/Argentina	-	09/2008	<i>E. bogotense</i>
11	comercial	Argentina	Cola de Caballo	-	<i>E. giganteum</i>
12	coleta	Argentina	-	09/2005	<i>E. giganteum</i>
13	coleta	Argentina	-	2007	<i>E. giganteum</i>
14	coleta	San Luis/Argentina	-	1994	<i>E. giganteum</i>
15	coleta	Argentina	-	-	<i>E. giganteum</i>
16	matéria-prima	Barcelona/Espanha	<i>E. arvense</i> L.	07/2008	<i>E. arvense</i>
17	cápsulas	França	<i>E. arvense</i> L.	03/2009	n.i.
18	coleta	Curitiba/PR	-	08/2009	<i>E. hyemale</i>
19	coleta	Mostardas/RS	-	-	<i>E. hyemale</i>
20	coleta	Santo Antonio da Patrulha/RS	-	05/2011	<i>E. giganteum</i>
21	comercial	Brasil	<i>E. arvense</i>	04/2011	<i>E. giganteum</i>

\* n.i.: espécie não identificada. O fato do material estar rasurado ou moído não permitiu sua correta identificação.



Para a coleta do material vegetal no Brasil, foi solicitado ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) o comprovante de registro para coleta de material botânico sob o número de registro: 20368-1.

As partes aéreas de *E. giganteum* e outras espécies provenientes de coleta foram secas à sombra e posteriormente cominuídas em moinho de facas. O material foi armazenado em recipiente de vidro, hermeticamente fechado, e mantido à -18 °C, até o momento do uso.

### **2.3 Avaliação de presença de alcalóides em *Equisetum* spp.**

Para avaliação da presença de alcalóides em *Equisetum*, foram obtidas frações de alcalóides totais de *E. giganteum* (amostras 1, 2, 7 e 12), *E. hyemale* (amostra 18), *E. arvense* (amostra 16), cápsulas de *E. arvense* (amostra 17) e *E. bogotense* (amostra 10), empregando-se para isto metodologia baseada na descrita por Wagner e Bladt (1996, p. 4). Basicamente, 1 g de amostra moída (tamanho de partícula < 0,355 mm) foi extraída por sonicação, durante 15 min, com 20 mL de ácido sulfúrico 0,1 N e então filtrada por algodão hidrófilo. O algodão foi reunido ao resíduo e re-extraído com 5 mL de ácido sulfúrico 0,1 N. As frações foram reunidas e filtradas por filtro de papel para um balão volumétrico de 25 mL. O filtro de papel foi lavado e o volume completado com ácido sulfúrico 0,1 N. Esta solução foi transferida para uma ampola de decantação e lavada com 10 mL de hexano:acetato de etila (1:1). Adicionou-se 1 mL de hidróxido de amônio e extraiu-se 2 vezes com 10 mL, por vez, de diclorometano. As frações orgânicas foram combinadas e filtradas sobre 5 g de sulfato de sódio anidro, lavando-se o sulfato de sódio com 5 mL de diclorometano. Esta fração foi levada à secura e o resíduo foi ressuspenso em 50 µl de metanol (grau HPLC, Tedia). Vinte e cinco microlitros de cada amostra foram aplicadas na cromatoplaça de gel de sílica GF<sub>254</sub> (Merck). Cinco microlitros de solução metanólica de nicotina 1% (m/v), foram empregados para aplicação desta como substância de referência. Metanol (grau HPLC, Tedia) foi empregado como fase móvel, em migração ascendente, em cuba saturada com hidróxido de amônio. Após o solvente ter sido completamente eliminado, a placa foi nebulizada com Reagente de Dragendorff (WAGNER, BLADT, 1996, p. 360) e observada sob luz visível após 10-20 min.

## 2.4 Avaliação de presença de alcalóides em extratos de *E. giganteum*

Para avaliação da presença de alcalóides em extratos de *E. giganteum*, foram preparadas frações de alcalóides totais a partir de extratos aquosos e etanólicos 50% de outras duas amostras desta espécie, uma amostra proveniente de coleta (amostra 20) e outra comercial (amostra 21).

Os extratos foram obtidos empregando-se água destilada ou etanol 50% (v/v) como líquido extrator, na proporção droga:solvente de 1:25 (m/v). Para isto, 1,01 g de amostra cominuída (< 0,355 mm) foi submetida à extração durante 2 h, a 60 °C sob agitação constante, em tubo de centrifuga de 50 mL com tampa (tipo Falcon). Ao final, as amostras foram filtradas por papel filtro para balão volumétrico e o resíduo lavado com o mesmo solvente até completar o volume de 25 mL. O extrato hidroetanólico foi concentrado em evaporador rotatório em temperatura inferior a 35 °C, até a eliminação completa do etanol. O resíduo foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada.

Os extratos foram transferidos para ampola de decantação, onde foi adicionado 0,1 mL de ácido sulfúrico concentrado e então lavados com 10 mL de hexano:acetato de etila (1:1). Adicionou-se 1 mL de hidróxido de amônio e extraiu-se 2 vezes com 10 mL, por vez, de diclorotemano. As frações orgânicas foram reunidas e filtradas sob 5 g de sulfato de sódio anidro, lavando-se o sulfato de sódio com 2 mL de diclorometano. Esta fração foi levada à secura e o resíduo ressuspense em pequenas quantidades de metanol (grau HPLC, Tedia) e transferido para microtubos.

Comparativamente, estas amostras de *E. giganteum* (1,01 g, < 0,355 mm) também foram submetidas ao processo de extração conforme descrito na técnica do item 2.3, sendo ao final as frações diclorometânicas secas, o resíduo ressuspense em pequenas quantidades de metanol (grau CLAE, Tedia) e transferido para microtubos.

Após eliminação do metanol nos microtubos, o resíduo foi ressuspense em 100 µL de metanol (grau CLAE) e 20 µL de cada amostra foram aplicadas na cromatoplaça de gel de sílica GF<sub>254</sub> (marca Whatman). Cinco microlitros de nicotina, solução a 1% (m/v) em metanol, foi empregada como substância de referência.

Metanol (grau CLAE, Tedia) foi empregado como fase móvel, em migração ascendente, em cuba saturada com hidróxido de amônio. Após o solvente ter sido completamente eliminado, a placa foi nebulizada com Reagente de Dragendorff (WAGNER, BLADT, 1996, p. 360) e observada à luz visível após 10-20 min.

Análise cromatográfica em condições idênticas às acima descritas, com exceção do volume de amostra aplicado de 100  $\mu$ L, foram realizadas empregando as frações hexano:acetato de etila (1:1), provenientes da lavagem dos extratos, e as frações aquosas alcalinas oriundas do processo de extração da fração de alcalóides totais.

Com o objetivo de avaliar o teor aproximado de alcalóides totais em *E. giganteum*, foi obtida nova fração de alcalóides a partir de maior massa de amostra (amostra 1). Para obtenção desta fração, adicionou-se 250 mL de HCl 10% (m/v) a 35,7 g de planta seca moída (< 0,355 mm), esta mistura foi submetida à agitação em banho-maria à 40 °C durante 30 min e, após à resfriamento, sendo em seguida filtrada por algodão hidrófilo. O filtrado foi transferido para funil de separação e agitado com duas porções de 20 mL de *n*-hexano e acetato de etila (1:1, v/v). A fração aquosa teve o pH ajustado para valor de 10-11 com hidróxido de amônio 6 M e sendo então extraída com três porções de 30 mL de diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas em evaporador rotatório até a secura. O resíduo obtido, denominada fração de alcalóides totais, teve sua massa quantificada para cálculo do rendimento.

Esta fração foi ressuspensa em 1 mL de metanol (grau CLAE), e então 10  $\mu$ L foram aplicados na cromatoplaça e analisados conforme descrito anteriormente.

## **2.5 Avaliação de presença de tiamina em *Equisetum* spp.**

Para avaliação da presença de tiamina em *Equisetum* spp., as frações de alcalóides totais de *E. giganteum* (amostras 1, 2, 7 e 12), *E. hyemale* (amostra 18), *E. arvense* (amostra 16), cápsulas de *E. arvense* (amostra 17) e *E. bogotense* (amostra 10) previamente obtidas, foram submetidas à análise cromatográfica sob as mesmas condições de análise descritas no item 2.3. Em substituição à substância

de referência nicotina, foram aplicados 5 µL de solução cloridrato de tiamina 1% (m/v) em metanol (grau HPLC, Tedia).

## **2.6 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de *Equisetum* spp. empregando cromatografia em camada delgada (CCD)**

O método utilizado segue aquele preconizado por Wagner e Bladt (1996) e pelas Farmacopéias Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005) e Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011) para “horsetail” (*E. arvense* L.). Estes métodos foram utilizados, na tentativa de comparar os resultados obtidos para as espécies avaliadas com os dados já existentes para outras espécies do gênero.

A análise cromatográfica empregada na avaliação de compostos fenólicos em *E. giganteum* e outras espécies do gênero foi realizada empregando-se o sistema cromatográfico constituído de gel de sílica GF<sub>254</sub> como fase estacionária e ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) como fase móvel.

As amostras foram preparadas pesando-se 0,3 g de material vegetal (< 0,355 mm) e aquecendo-o à 60 °C com 3 mL de metanol, por 10 min. Estas foram centrifugadas (4000 rpm por 10 min), o sobrenadante foi aplicado na cromatoplaça e submetidas ao sistema proposto. Após o solvente ter sido completamente eliminado, a fim de evitar a presença dos ácidos, a placa foi revelada com Reagente Natural (solução metanólica de difenilborato de amino-etil éster 1%, m/v) e posteriormente visualizada sob luz UV a 365 nm.

Como substâncias de referência foram empregadas soluções metanólicas de rutina, isoquercitrina, ácido clorogênico e/ou ácido caféico na concentração aproximada de 0,05% (m/v). Os volumes de amostra e de substância referência aplicadas foram de, aproximadamente, 10 µL.

Comparativamente, avaliou-se também o emprego de etanol e água (1:10, m/v) como líquido extrator, e ácido fórmico:metanol:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) como fase móvel.

## 2.7 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de *Equisetum* spp. empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Diferentes amostras de *Equisetum* foram empregadas em cada parte desta análise, estando descritas nos resultados específicos para cada método.

### 2.7.1 Método A

#### Preparação da amostra

Inicialmente foram preparadas soluções extrativas metanólicas seguindo a metodologia descrita na seção 2.6. Após sua obtenção, as soluções extrativas foram centrifugadas e os sobrenadantes filtrados (membrana 0,45  $\mu\text{m}$ , PVDF, Millipore, Bedford, EUA), sendo posteriormente analisados empregando-se os parâmetros cromatográficos descritos a seguir.

#### Parâmetros cromatográficos

Testes preliminares (dados não mostrados) basearam a escolha dos parâmetros cromatográficos empregados, os quais estão apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Parâmetros cromatográficos utilizados na análise por CLAE de soluções extrativas de diferentes espécies de *Equisetum*.

Parâmetro	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Arranjo de diodos - Waters PDA 996
Coluna	Waters Nova-Pak C18, 3,9x150 mm, 4 $\mu\text{m}$
Pré-coluna	Bondapak C18, 1,8x20 mm, 37-55 $\mu\text{m}$
Sistema de eluição	Gradiente linear
Fase móvel	Água acidificada com TFA <sup>1</sup> 0,05% (v/v), pH ~2,2 (A) e acetonitrila (B)
Vazão	0,8 mL/min
Temperatura	24 $\pm$ 3 $^{\circ}\text{C}$ <sup>2</sup>
Volume de injeção	10 $\mu\text{L}$
Comprimento de onda de detecção	210-400 nm

<sup>1</sup> TFA: ácido trifluoroacético

<sup>2</sup> Sem emprego de forno para a coluna

A fase móvel utilizada na análise, constituída de solventes com alto grau de pureza como água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), acetonitrila (grau CLAE, Tedia Company, OH, USA) e ácido trifluoroacético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), foi previamente filtrada através de membrana 0,45 µm (Millipore, Bedford, EUA) e, degaseada durante 30 min. por sonicação, sob pressão reduzida. O sistema utilizado de gradiente linear encontra-se descrito na Tabela 3.3

**Tabela 3.3** Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE, Método A

Tempo (min.)	A (% v/v)	B (% v/v)
0	97	3
50	83	17
55	75	25
57	0	100
64	0	100

A eluição dos compostos foi monitorada empregando-se o aplicativo *Empower 2002* (Waters, Milford/USA), em comprimento de onda de 285 nm.

### 2.7.2 Método B

Constitui-se em outro método de extração e novos parâmetros cromatográficos foram empregados a fim de avaliar o perfil cromatográfico dos metabólitos secundários de *E. giganteum*, *E. arvense* e *E. hyemale*.

#### Preparação da amostra

Para a extração do material vegetal empregou-se método descrito por Veit e col. (1995b). Aproximadamente 1 g de material vegetal seco e moído (< 0,355 mm) foi extraído com 20 mL de Metanol a 60 °C, por 5 min, e filtrado por algodão hidrófilo. O procedimento foi repetido mais duas vezes com 10 mL de solvente, em cada processo, o algodão da filtragem foi re-extraído, juntamente com o marco. As soluções extrativas foram filtradas por papel filtro, reunidas, e o solvente foi removido sob pressão reduzida.

O resíduo foi ressuspenso em 2,5 mL de metanol, com auxílio de ultrassom, adicionado de 0,5 mL de água ultrapura e filtrado por cartuchos de SPE (Strata C18-E), com 0,2 g de fase estacionária, os quais foram pré-condicionados com 3 mL de MeOH e 3 mL de água. Os compostos fenólicos foram eluídos com MeOH:H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) para um balão volumétrico, até completar 5 mL. A amostra foi filtrada (membrana 0,45 µm) e empregada na análise por CLAE.

Comparativamente, foram preparadas soluções extrativas aquosas destas amostras, onde 0,5 g de planta foi extraída com 10 mL de água destilada, sob agitação, por 30 min. Posteriormente a mistura foi centrifugada e o sobrenadante filtrado (membrana 0,45 µm) antes de ser injetado no cromatógrafo.

#### Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos empregados foram os mesmos descritos no item 2.7.1, com exceção daqueles descritos na Tabelas 3.4 e 3.5.

**Tabela 3.4** Parâmetros cromatográficos utilizados na análise das soluções extrativas de *E. giganteum*, *E. arvense* e *E. hyemale*.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Phenomenex Luna C18(2), 4,6x250 mm, 5 µm
Fase móvel	Água acidificada com TFA <sup>1</sup> 0,05% (v/v), pH ~2,2 (A) e metanol (B)
Vazão	0,8 mL/min
Volume de injeção	15 µL
Comprimento de onda de detecção	210-400 nm

<sup>1</sup> TFA: ácido trifluoroacético

A eluição dos compostos foi monitorada empregando-se o aplicativo *Empower* 2002 (Waters), em comprimento de onda de 280 nm.

**Tabela 3.5** Sistema gradiente linear utilizado para análise por CLAE, Método B

Tempo (minutos)	A (% v/v)	B (% v/v)
0	77	23
12	77	23
21	65	35
38	55	45
48	40	60
68	0	100
75	0	100

## 2.8 Avaliação preliminar por CLAE dos processos extrativos em *E. giganteum*

Neste experimento, foram avaliados três métodos extrativos: (i) extração sob sonicação a 25 °C durante 30 min; (ii) extração sob agitação a 25 °C durante 60 min; e (iii) extração sob agitação a 60 °C durante 15 min.

Os líquidos extratores empregados em cada um dos métodos foram: água destilada, etanol (nas concentrações de 100, 80 e 50%, v/v) e metanol (nas concentrações de 100, 80 e 50%, v/v).

Sonicador com frequência de 40 kHz (modelo USC-3300, Unique - SP), e agitador magnético (modelo ARE, Velp Scientifica), com ou sem aquecimento, foram empregados.

A aproximadamente 200 mg da droga vegetal cominuída (< 0,355 mm) de *E. giganteum* (amostra 1), foram adicionados 4 mL de líquido extrator. A extração procedeu-se em tubo de ensaio de vidro tampado (capacidade para 5 mL). Ao final do processo extrativo, o material foi centrifugado (4000 rpm por 10 min) e o sobrenadante filtrado (membrana 0,45 µm, PVDF, Millipore). Dez microlitros de cada solução extrativa foram injetados no CLAE, empregando os parâmetros cromatográficos descritos no Método B (item 2.5.2), substituindo o ácido trifluoroacético por ácido fórmico a 0,3%.

Os picos cromatográficos foram integrados automaticamente, empregando-se o aplicativo *Empower 2002* (Waters) em comprimento de onda de 280 nm. Os



resultados provenientes de uma determinação de cada condição foram avaliados, e pela complexidade do cromatograma, apenas picos com área superior a 50.000 unidades de absorvância (UA) foram utilizados na comparação dos resultados.

A metodologia que apresentou os melhores resultados quali/quantitativos preliminares no perfil cromatográfico foi avaliada novamente, desta vez sendo realizada três determinações para o cálculo dos desvios padrões.

## **2.9 Atividade capturadora de radicais livres: ensaio de autografia em CCD**

Para uma avaliação prévia da presença de substâncias com possível atividade capturadora de radicais em *E. giganteum* foi utilizado ensaio químico por autografia envolvendo o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>).

Para avaliar esta atividade, o extrato metanólico de *E. giganteum* obtido conforme item 2.2 (Análise qualitativa) foi submetido ao sistema cromatográfico também proposto nesse item, e após eliminação do solvente, a placa foi revelada com uma solução de DPPH<sup>•</sup> a 0,2% em metanol e visualizada sob luz visível, por até 30 min (BRACA *et al.*, 2002).

## **2.10 Procedimentos para tratamento dos resíduos**

Os resíduos gerados nas diferentes etapas do trabalho foram descartados seguindo o Plano de Gerenciamento de Resíduos estabelecido pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT/FAR), fundamentado na Resolução RDC nº 306, de 07/12/04, da ANVISA e na Resolução nº 358, de 29/04/05, do CONAMA.

Durante os experimentos tentou-se diminuir, na medida do possível, a geração de resíduos. Estes foram segregados de acordo com suas características, acondicionados em embalagens apropriadas e identificados de forma clara e duradoura nos rótulos modelos. Posteriormente, foram encaminhados para a área provisória de descarte e, na sequência, enviados para a recuperação, incineração

em empresa licenciada ou a aterro sanitário, seguindo todas as etapas do Plano de Gerenciamento de Resíduos, inclusive na elaboração dos registros.

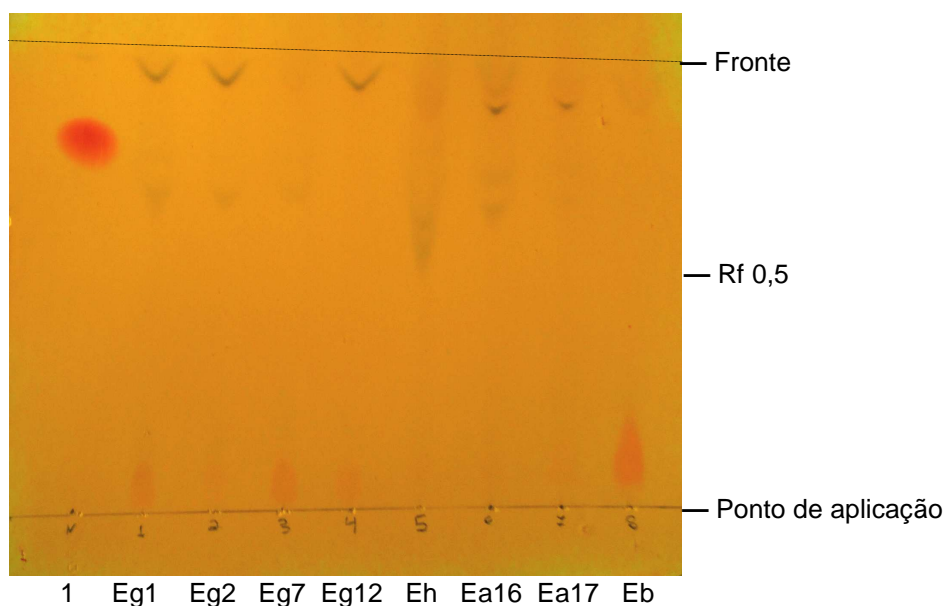
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação de presença de alcalóides em *Equisetum* spp.

Para a avaliação da presença de alcalóides em *Equisetum* spp., foram preparadas frações de alcalóides totais de *E. giganteum* (amostras 1, 2, 7 e 12), *E. hyemale* (amostra 18), *E. arvense* (amostra 16), cápsulas de *E. arvense* (amostra 17) e *E. bogotense* (amostra 10), empregando-se para isto metodologia baseada naquela descrita por Wagner e Bladt (1996, p.4).

Após análise cromatográfica das frações de alcalóides e tratamento da placa com o reagente de Dragendorff (onde alcalóides geralmente desenvolvem coloração vermelho-acastanhada sob luz visível), pôde-se visualizar manchas com estas características, com fator de retenção ( $R_f$ ) de aproximadamente 0,1 nos extratos de todas as amostras avaliadas (Figura 3.1). *E. giganteum* e *E. bogotense* foram as espécies que apresentaram manchas mais intensas. Para *E. hyemale* e *E. arvense*, as manchas apresentavam coloração quase imperceptíveis. Mancha característica do alcalóide nicotina ( $R_f \sim 0,8$ ), ou com  $R_f$  próximo, não pôde ser visualizada no extrato de nenhuma das amostras analisadas.

Apesar da presença de alcalóides ser amplamente relatada no gênero *Equisetum*, principalmente de nicotina, não foi possível observar mancha característica deste alcalóide nas amostras avaliadas. Se este composto estiver presente, sua concentração é extremamente baixa, não podendo ser detectada pelo método empregado. Os compostos com reação positiva frente ao reagente Dragendorff no cromatograma das amostras de *Equisetum* (Figura 3.1), quando comparados aos alcalóides presentes em *E. palustre* (WAGNER, BLADT, 1996, p. 227), apresentam polaridade bem mais elevada, indicando não tratar-se dos mesmos compostos.



**Figura 3.1** Análise comparativa por CCD das frações de alcalóides totais de *E. giganteum* (**Eg1**: amostra 1, **Eg2**: amostra 2, **Eg7**: amostra 7 e **Eg12**: amostra 12), *E. hyemale* (**Eh**: amostra 18), *E. arvense* (**Ea16**: amostra 16), cápsulas de *E. arvense* (**Ea17**: amostra 17), *E. bogotense* (**Eb**: amostra 10), e **1**, substância de referência nicotina ( $R_f \sim 0,9$ ). Fase móvel: MeOH; cuba saturada com hidróxido de amônio. Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Visualização sob luz visível após nebulização com o reagente de Dragendorff.

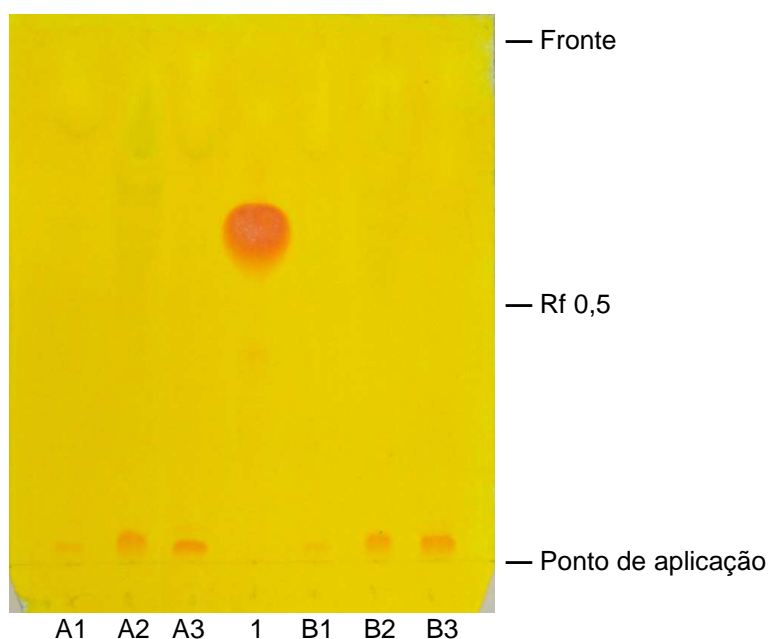
### 3.2 Avaliação de presença de alcalóides em extratos de *E. giganteum*

A fim de avaliar a influência do solvente na extração dos possíveis alcalóides presentes em *E. giganteum*, duas novas amostras, uma comercial e outra proveniente de coleta, foram submetidas a processo extrativo empregando solventes usuais: água e etanol 50%. A fração de alcalóides totais destes extratos foi comparada, semi-quantitativamente através de CCD, às frações das matérias-primas vegetais. O rendimento destas frações, obtidas após secagem nos microtubos, não pôde ser determinado, devido a seu baixo teor e dificuldade de pesagem em balança analítica.

Na análise cromatográfica das frações de alcalóides totais das duas amostras de *E. giganteum* e das frações de seus extratos aquosos e etanólicos 50% (Figura 3.2), não foi possível observar manchas características da substância de referência

nicotina ( $R_f$  0,65), enquanto que manchas com reação positiva para o reagente Dragendorff, com  $R_f$  de aproximadamente 0,03, puderam ser observadas em todas as amostras avaliadas. Estes dados estão de acordo com o que pôde ser visualizado nos cromatogramas de outras amostras de *Equisetum* e *E. giganteum* (Figuras 3.1).

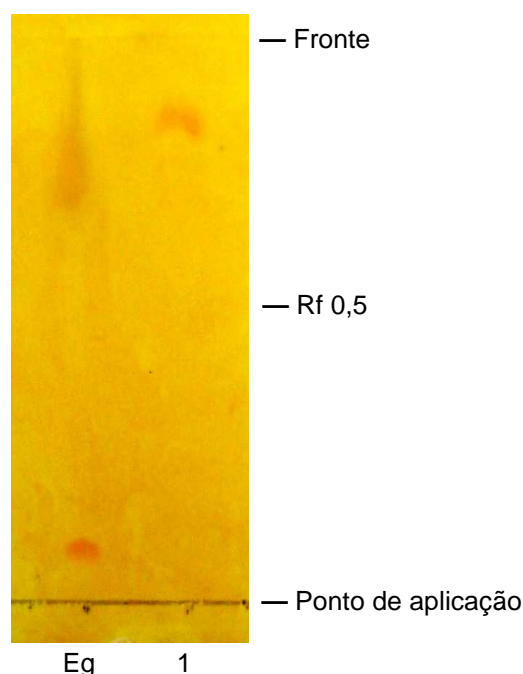
Pequenas diferenças quantitativas nos perfis cromatográficos puderam ser observadas no cromatograma das amostras avaliadas, com menor intensidade nas manchas do extrato aquoso. Estes dados indicam um efeito do solvente, da metodologia ou da matriz vegetal durante o processo de extração sobre os compostos com reação positiva para alcalóides presentes em *E. giganteum* (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais da matéria-prima vegetal e dos extratos de duas amostras de *E. giganteum* (**A**: amostra 20, **B**: amostra 21). **A1** e **B1**: fração de alcalóides totais do extrato aquoso, **A2** e **B2**: fração de alcalóides totais do extrato etanólico 50%, **A3** e **B3**: fração de alcalóides totais da matéria-prima vegetal, e, **1**, substância de referência nicotina ( $R_f$  0,65). Fase móvel: MeOH; cuba saturada com hidróxido de amônio. Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub> (marca Whatman). Visualização sob luz visível após nebulização com o reagente de Dragendorff.

Não foi possível observar manchas características de alcalóides na análise cromatográfica das frações hexano:acetato de etila (1:1), resultantes da lavagem dos extratos aquosos e etanólicos 50%, e das frações aquosas alcalinas oriundas do processo de extração da fração de alcalóides totais destes extratos, nas duas amostras de *E. giganteum*. Estes dados demonstram a seletividade de extração e purificação do processo de Stass-Otto para os compostos com reação positiva para alcalóides presentes nas amostras. Desta maneira, a análise semi-quantitativa das frações de alcalóides totais anteriormente analisadas pôde ser determinada com segurança.

Quanto à avaliação quantitativa de alcalóides em *E. giganteum*, obteve-se após a extração pelo método proposto, uma fração com rendimento de 0,015% (m/m). Após análise cromatográfica desta fração por CCD, verificou-se a presença de apenas uma mancha com coloração alaranjada ( $R_f \sim 0,1$ ). A mancha característica do alcalóide nicotina ( $R_f \sim 0,9$ ) novamente não foi visualizada no extrato obtido de *E. giganteum* (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais de *E. giganteum* (amostra 1), **Eg**; e substância de referência nicotina ( $R_f \sim 0,9$ ), **1**. Fase móvel: MeOH; cuba saturada com hidróxido de amônio. Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Visualização sob luz visível após nebulização com o reagente de Dragendorff.

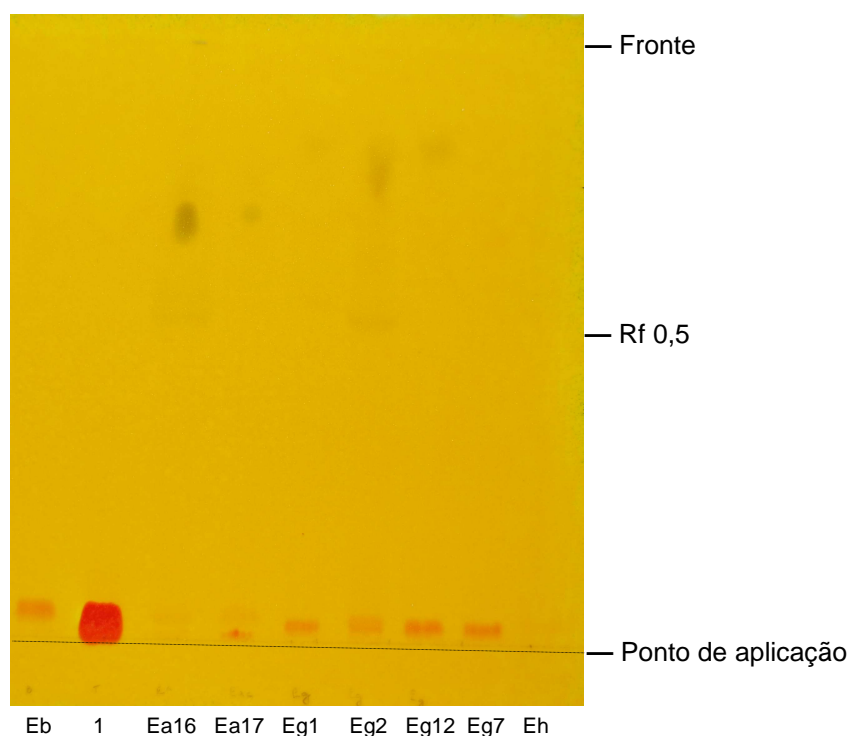
Para *E. arvense* tem sido relatado um teor de 0,255% de alcalóides totais, expressos como atropina, quantificados em ensaio colorimétrico com verde de bromocresol (SHAMSA *et al.*, 2008). Este teor é bem superior ao encontrado para *E. giganteum*, apesar das diferenças nos métodos de análise e, considerando tratar-se de alcalóides os produtos com Rf's próximos a 0,1.

### 3.3 Avaliação de presença de tiamina em *Equisetum* spp.

A elevada polaridade apresentada pelos compostos com reação positiva frente ao reagente Dragendorf, observados nos cromatogramas das frações de alcalóides totais de amostras de *Equisetum* (Figuras 3.1 e 3.2), mostrou-se condizente com compostos nitrogenados como alguns aminoácidos e vitaminas hidrossolúveis. Desta maneira, considerando que a tiamina, uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, já havia sido relatada em *E. ramosissimum* (MEYER, 1989), sua presença nestas amostras foi investigada, empregando o sistema cromatográfico anteriormente descrito para a avaliação de alcalóides.

No cromatograma da substância de referência tiamina, observa-se apenas uma mancha de coloração vermelha bem intensa (reação positiva para alcalóide), com Rf de aproximadamente 0,04, enquanto nos cromatogramas das outras amostras de *Equisetum*, manchas com coloração e Rf's semelhantes (Rf de 0,01 a 0,05) podem ser observadas (Figura 3.4). Desta maneira, é possível propor que os compostos com reação positiva para alcalóides, apresentando Rf < 0,1, observados nos cromatogramas de amostras de *Equisetum* (Figuras 3.1 a 3.4), correspondam à tiamina (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>OS) ou outra vitamina do complexo B.

Comparando os perfis cromatográficos dos extratos obtidos por partição ácido-base (Figura 3.4), é possível verificar uma variação na intensidade das manchas com reação positiva para alcalóide (possivelmente tiamina), entre as diferentes amostras de *Equisetum* analisadas sendo que *E. giganteum* e *E. bogotense* são as que apresentam maiores intensidades nestas manchas.



**Figura 3.4** Análise comparativa por CCD da fração de alcalóides totais de *E. bogotense* (**Eb**: amostra 10), *E. arvense* (**Ea16**: amostra 16), cápsulas de *E. arvense* (**Ea17**: amostra 17), *E. giganteum* (**Eg1**: amostra 1, **Eg2**: amostra 2, **Eg7**: amostra 7 e **Eg12**: amostra 12), *E. hyemale* (**Eh**: amostra 18), e, **1**, substância de referência tiamina ( $R_f \sim 0,04$ ). Fase móvel: MeOH; cuba saturada com hidróxido de amônio. Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Visualização sob luz visível após nebulização com o reagente de Dragendorff.

Levando-se em consideração que a fração de alcalóides totais obtida de *E. giganteum* apresentou um rendimento de 0,015% (m/m) em relação à massa de planta, e que apenas uma parte desta fração possa ser constituída de tiamina (ou outra vitamina do complexo B), podemos esperar um teor inferior a 150 µg/g de tiamina nesta amostra, mas possivelmente superior à concentração de 0,1 µg/g relatada para *E. ramosissimum* (MEYER, 1989).

Na análise cromatográfica das frações de alcalóides totais das duas amostras de *E. giganteum* e das frações de alcalóides totais de seus extratos aquosos e etanólicos 50% (Figura 3.3), foi possível observar diferenças quantitativas entre os composto com reação positiva para alcalóide (tiamina ou outra vitamina do complexo B) nos perfis cromatográficos, com menor rendimento para os extratos aquosos. O emprego de água destilada como líquido extrator, sob agitação a 60 °C por 2 h,

forneceu menor quantidade destes compostos, aproximadamente 30% daquela observada no extrato hidroetanólico ou na fração obtida diretamente a partir da planta, quando comparados visualmente (Figura 3.3). Considerando que a tiamina apresenta maior solubilidade em água que em álcool (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), espera-se que o menor rendimento empregando água como solvente na extração seja devido à sua degradação durante o processo extrativo, já que a temperatura, o pH, o aquecimento e o processamento podem causar a decomposição da tiamina (BEADLE *et al.*, 1943; DWIVEDI, ARNOLD, 1973). Outro fator que poderia contribuir para a degradação de tiamina em meio aquoso, seria a ativação da enzima tiaminase, possivelmente presente em *E. giganteum* e já relatada para *E. ramosissimum* (MEYER, 1989).

### **3.4 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de *Equisetum* spp. empregando cromatografia em camada delgada (CCD)**

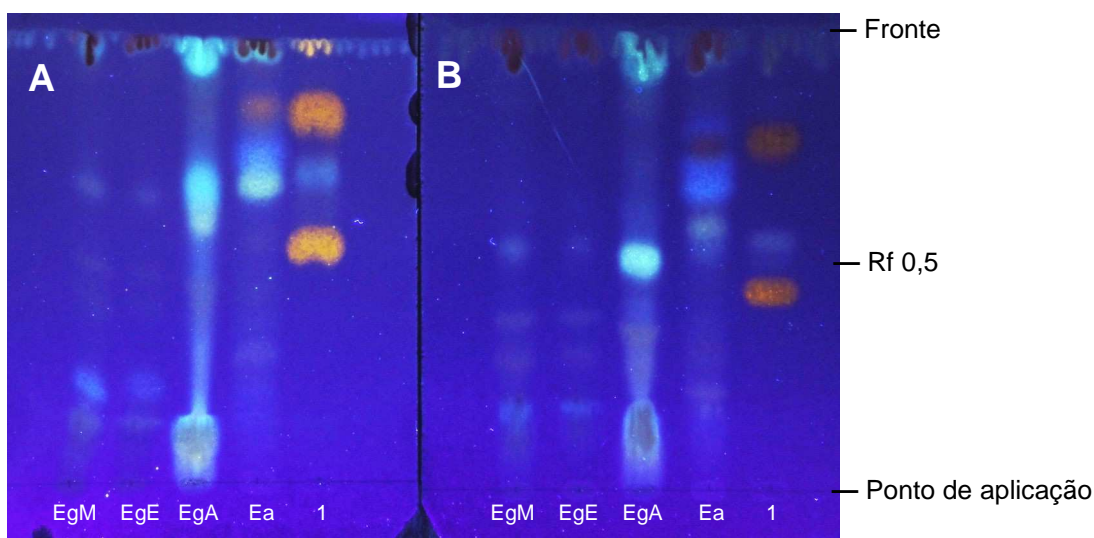
Cromatografia em camada delgada (CCD) é o método de escolha para análise qualitativa de plantas medicinais antes de serem empregados outros métodos mais modernos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este método apresenta como vantagens sua simplicidade, versatilidade, rapidez, sensibilidade específica e simplicidade na preparação das amostras. Desta maneira, se mostra conveniente para determinar a qualidade e possível adulteração em produtos fitoterápicos, sendo ainda descrito em várias Farmacopéias como ferramenta para a caracterização de matérias-primas vegetais, fornecendo as primeiras características qualitativas e semi-quantitativas destas. Mas, por outro lado, os métodos empregados na extração e preparação da amostra também desempenham grande importância na obtenção de bons perfis químicos (LIANG *et al.*, 2004).

Inicialmente, para análise do perfil cromatográfico de *E. giganteum*, avaliou-se a extração empregando-se metanol, etanol ou água (1:10, m/v) como líquido extrator, sob aquecimento a 60 °C por 10 min, como também o emprego de duas fases móveis: ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila



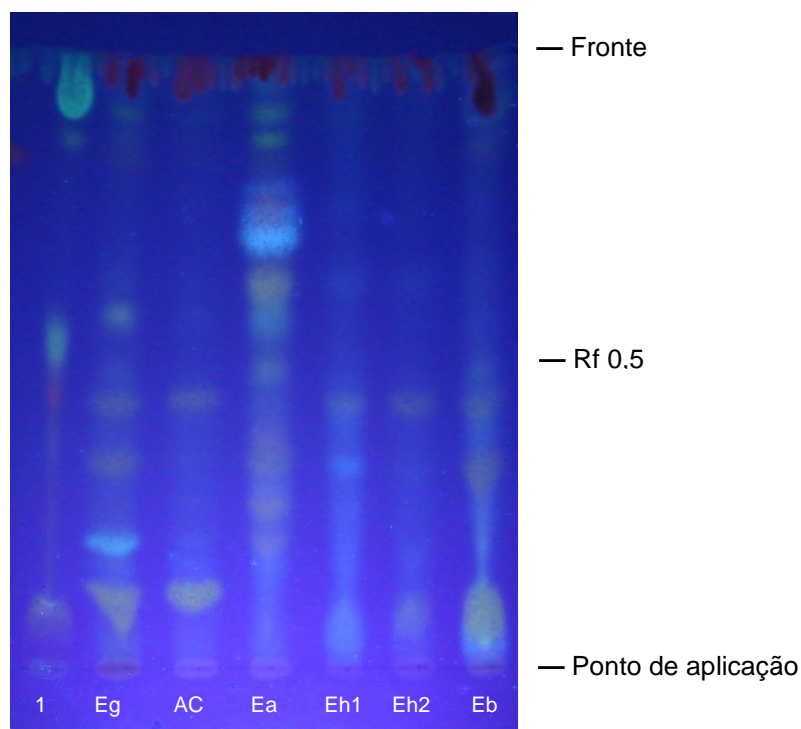
(11:11:26:100, v/v) (FM A) e ácido fórmico:metanol:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) (FM B).

A Figura 3.5 revela que entre os três solventes empregados na extração, a água extraiu seletivamente alguns constituintes, não se mostrando muito adequada para análise qualitativa, além de apresentar, na análise cromatográfica, uma menor resolução entre os constituintes extraídos. Quando álcoois foram utilizados na extração, não se verificou diferença qualitativa considerável entre eles, optando-se pelo metanol como líquido extrator pela facilidade de aplicação da amostra, extração de maior quantidade de alguns constituintes e pelo fato de constar na literatura para *E. arvense* (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011; WAGNER, BLADT, 1996). O emprego da FM B promoveu a diminuição do Rf dos compostos presentes, mostrando-se mais adequada para *E. arvense*, mas não para *E. giganteum*, já que este último possui maior número de compostos com Rf inferiores a 0,5-0,6.



**Figura 3.5** Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico (**EgM**), etanólico (**EgE**) e aquoso (**EgA**) de *E. giganteum* (amostra 1); extrato metanólico de *E. arvense* (amostra 16) (**Ea**); e substâncias de referência rutina - Rf ~ 0,5, ácido clorogênico - Rf ~ 0,7, e isoquercitrina - Rf ~ 0,8 (**1**). Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Fase móvel: ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) (**placa A**) e ácido fórmico:metanol:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) (**placa B**). Visualização sob luz UV a 365 nm após nebulização com Reagente Natural.

Pelos resultados obtidos e pela falta de dados na literatura para comparação do perfil cromatográfico de *E. giganteum*, optou-se por utilizar a fase móvel A neste tipo de análise, já que Wagner e Bladt (1996, p. 226 e 227) apresentam o perfil cromatográfico de algumas espécies do gênero empregando esta fase móvel, e estes dados podem subsidiar a interpretação dos resultados obtidos para as espécies de interesse.

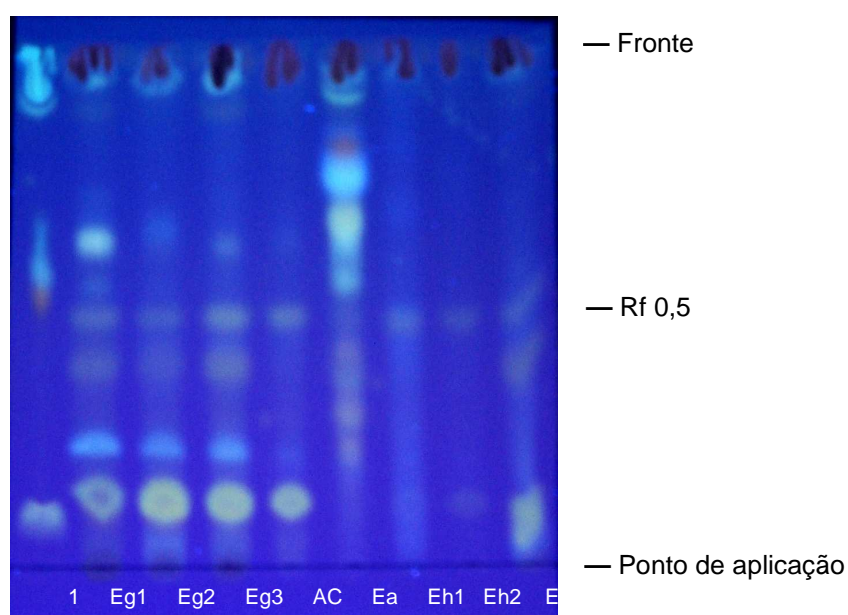


**Figura 3.6** Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico de diferentes amostras de *Equisetum* e substâncias de referência. Rutina, Rf ~ 0,45, ácido clorogênico, Rf ~ 0,54, e ácido caféico, Rf ~ 0,94 (**1**); *E. giganteum* (amostra 1) (**Eg**); amostra comercial Madrid/Espanha (amostra 9) (**AC**); *E. arvense* (amostra 16) (**Ea**); *E. hyemale* (amostra 19) (**Eh1**) e (amostra 18) (**Eh2**); e, *E. bogotense* (amostra 10) (**Eb**). Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Fase móvel: ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v). Visualização sob luz UV a 365 nm após nebulização com Reagente Natural.

No cromatograma do extrato metanólico de *E. giganteum* (Figuras 3.5, 3.6 e 3.7) pode-se verificar a presença de manchas fluorescentes azul-esverdeadas e amarelo-alaranjadas, características de compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonóides. Não foi possível detectar neste extrato manchas características das substâncias de referência empregadas: rutina (Rf ~ 0,5), ácido clorogênico (Rf ~ 0,7)

e isoquercitrina ( $R_f \sim 0,8$ ) (Figura 3.5). Mancha com  $R_f$  semelhante ao do ácido caféico pôde ser visualizada na placa. Contudo, levando-se em consideração a sua proximidade com o fronte, não é possível confirmar, com segurança, sua presença no cromatograma de *E. giganteum*, já que, o ácido ferúlico apresenta mancha com mesma coloração e  $R_f$  semelhante neste sistema (WAGNER, BLADT, 1996, p. 227).

As três amostras de *E. giganteum* analisadas, embora provenientes de diferentes *habitats* e regiões (na Argentina e nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, no Brasil), apresentaram perfil cromatográfico semelhante, principalmente das substâncias com  $R_f < 0,5$  (Figura 3.7). Estas manchas fluorescentes com baixo  $R_f$  podem indicar a presença de compostos altamente “glicosilados” (mais polares) no extrato de *E. giganteum*.



**Figura 3.7** Comparação do perfil cromatográfico do extrato metanólico de diferentes amostras de *Equisetum* e substâncias de referência. Rutina,  $R_f \sim 0,51$ , ácido clorogênico,  $R_f \sim 0,57$ , e ácido caféico,  $R_f \sim 0,94$  (**1**); *E. giganteum* (amostra 1) (**Eg1**) e (amostra 12) (**Eg2**); matéria-prima comercializada no Brasil (amostra 7) (**MP**); amostra comercial proveniente de Madrid/Espanha (amostra 9) (**AC**); *E. arvense* (amostra 16) (**Ea**); *E. hyemale* (amostra 19) (**Eh1**) e (amostra 18) (**Eh2**); e, *E. bogotense* (amostra 10) (**Eb**). Fase estacionária: gel de sílica GF<sub>254</sub>. Fase móvel: ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v). Visualização sob luz UV a 365 nm após nebulização com Reagente Natural.

O perfil cromatográfico de *E. arvense* (Figura 3.5) mostrou-se semelhante ao descrito na literatura, sendo possível verificar a presença da mancha alaranjada característica da isoquercitrina ( $R_f \sim 0,8$ ), descrita para *E. arvense* e *E. silvaticum* (WAGNER, BLADT, 1996, p. 227). Os principais compostos presentes no cromatograma de *E. arvense* apresentam menor polaridade quando comparados com os presentes nas outras espécies ( $R_f > 0,5$ ), além de se apresentarem em maior número (Figura 3.7).

Desta maneira, avaliando-se os cromatogramas, pode-se facilmente diferenciar a espécie *E. giganteum* de *E. arvense*, primeiramente pela presença de duas manchas fluorescentes na parte inferior do cromatograma, uma de coloração azulada ( $R_f \sim 0,23$ ) e outra de coloração alaranjada ( $R_f \sim 0,13$ ), as quais estão ausentes no cromatograma de *E. arvense*, mas aparecem em todas as amostras de *E. giganteum* (Figura 3.7). No cromatograma de *E. giganteum*, a maior parte de manchas visíveis e as mais intensas apresentam  $R_f < 0,5$ , enquanto que para *E. arvense* estas manchas apresentam  $R_f > 0,5$  (Figuras 3.6 e 3.7). Além disso, a mancha alaranjada com  $R_f \sim 0,8$ , característica de isoquercitrina, pôde ser visualizada apenas no cromatograma de *E. arvense*, podendo ser empregada como marcador negativo para *E. giganteum*.

*E. hyemale* e *E. bogotense* apresentaram perfil cromatográfico semelhantes, apresentando-se mais simples qualitativamente e quantitativamente, quando comparadas com os cromatogramas de *E. giganteum* e *E. arvense* (Figuras 3.6 e 3.7). No cromatograma destas espécies, a maior parte de manchas e as mais intensas apresentam  $R_f < 0,5$ , se assemelhando com aqueles apresentados pelas amostras de *E. giganteum*. Uma mancha alaranjada com  $R_f \sim 0,48$ , visualizada no cromatograma de *E. hyemale* e *E. bogotense*, e outra, de mesma coloração e com  $R_f \sim 0,39$ , visualizada no cromatograma de *E. bogotense*, também podem ser visualizadas no cromatograma de *E. giganteum* (Figura 3.7).

O perfil cromatográfico da matéria-prima comercializada no Brasil como *E. arvense* (amostra 7) foi semelhante àquele apresentado pelas amostras de *E. giganteum* e diferente do perfil apresentado pela amostra de *E. arvense* (Figura 3.7). Assim, estes dados demonstram que esta matéria-prima se trata, na verdade, de *E. giganteum*.

O perfil cromatográfico da amostra comercial adquirida em Madrid/Espanha, apesar de ter menor número de manchas, apresentou-se semelhante ao de *E. giganteum*, e com certeza pode-se dizer que esta amostra não se trata de *E. arvense*, tanto pelo perfil cromatográfico, quanto pela ausência de mancha característica da isoquercitrina (Figuras 3.5, 3.6 e 3.7).

Os resultados encontrados através da avaliação do perfil cromatográfico de diferentes espécies de *Equisetum* mostraram que este tipo de análise, apesar de sua simplicidade, é uma importante ferramenta que pode contribuir na identificação, autenticação e até mesmo no controle de qualidade destas espécies, podendo inclusive vir a auxiliar na classificação botânica deste gênero.

### **3.5 Avaliação do perfil de metabólitos secundários de *Equisetum* spp. empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A CLAE é uma técnica em uso ascendente no controle de qualidade de matérias-primas vegetais por permitir o desenvolvimento de métodos de análise qualitativa e quantitativa rápidos, seletivos e sensíveis. Compostos fenólicos de algumas espécies de *Equisetum* já foram avaliados utilizando esta técnica, sendo possível caracterizar os constituintes de cada espécie e auxiliando na diferenciação destas (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b).

Durante o desenvolvimento do sistema cromatográfico adequado para a avaliação do perfil químico da solução extrativa metanólica de *E. giganteum* e outras espécies do gênero, tanto amostras comerciais quanto provenientes de coleta, foram testados diferentes sistemas eluentes (isocráticos e gradientes), empregando como fases móveis água ultrapura e acetonitrila ou metanol, acidificadas ou não com ácido trifluoroacético ou ácido fosfórico.

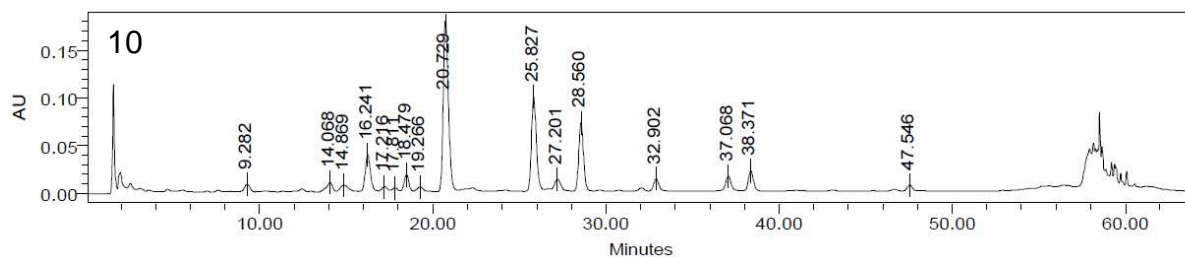
O sistema eluente (Tabelas 3.3 e 3.5, seção Materiais e Métodos) foi estabelecido considerando os melhores resultados obtidos na resolução dos picos e menor cauda destes, na constância na linha de base e no tempo necessário para a análise dos principais constituintes presentes nos extratos. O emprego de ácido fosfórico provocou desvio (elevação) na linha de base e não foi selecionado. O

emprego de temperatura de 30 °C diminuiu a resolução dos picos, sem afetar, consideravelmente, os tempos de retenção, por isso preferiu-se utilizar temperatura de 25 °C. Desta maneira, empregando-se a coluna Waters Nova-Pak, a fase móvel estabelecida foi água acidificada com TFA 0,05%, v/v, pH ~2,2 (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B) em gradiente linear.

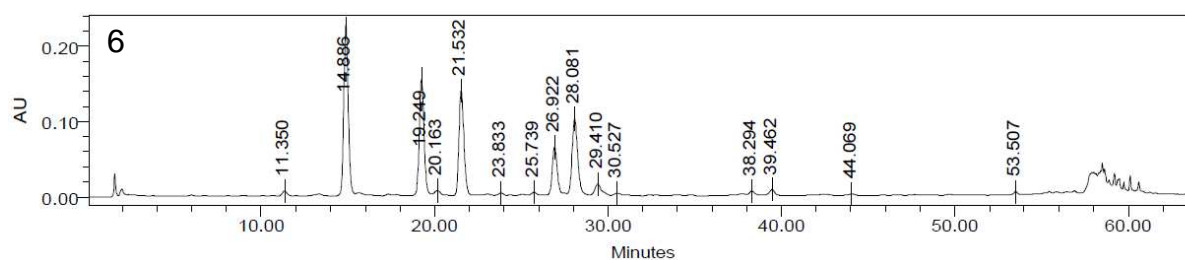
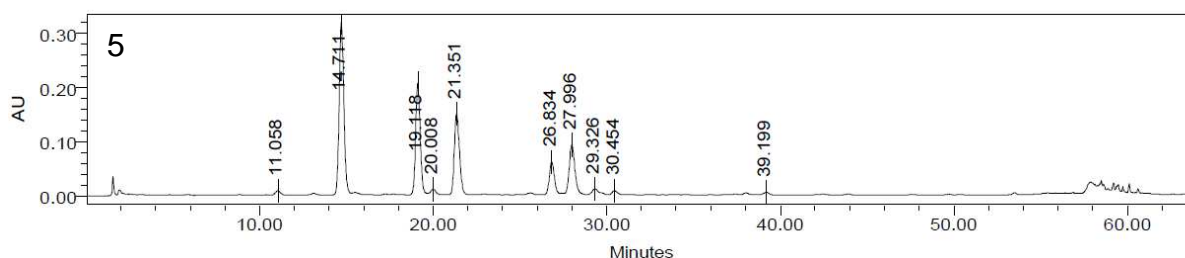
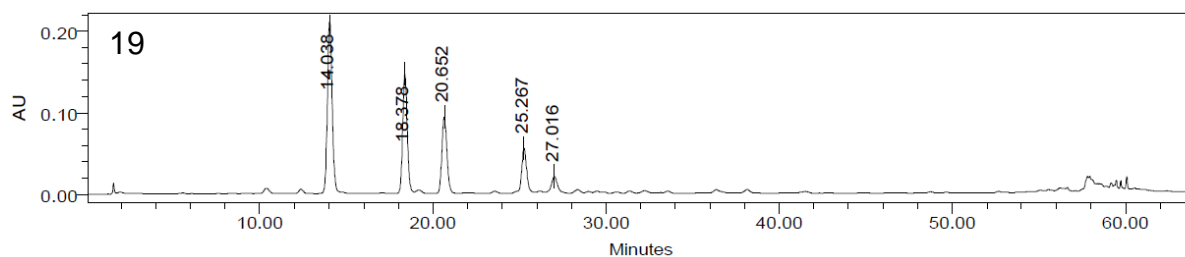
Os perfis cromatográficos a 285 nm, empregando-se o Método A, obtidos após a injeção das soluções extrativas de amostras de *Equisetum*, bem como os tempos de retenção dos picos selecionados podem ser observados nos cromatogramas da Figura 3.8 para a espécie *E. bogotense*, Figura 3.9 para *E. hyemale*, Figuras 3.10 e 3.11 para *E. giganteum*, Figura 3.12 para amostra de droga rasurada comercializada em Madrid/Espanha e Figura 3.13 para cápsulas de *E. arvense* proveniente da França.

A avaliação dos perfis cromatográficos revela, em todas as espécies, a presença de alguns constituintes com espectro de UV e tempos de retenção característicos de ácidos fenólicos e flavonóides heterosídicos (alguns exemplos são apresentados nas Figuras 3.14 a 3.18). Uma comparação mais minuciosa entre os sinais presentes nos cromatogramas das diferentes espécies se torna difícil e pode conduzir a erros, pois os cromatogramas são complexos, existe uma variação nos tempos de retenção dos compostos entre as análises, os espectros de UV de muitos compostos se mostram semelhantes e existe ainda a possibilidade de co-eluição de alguns compostos.

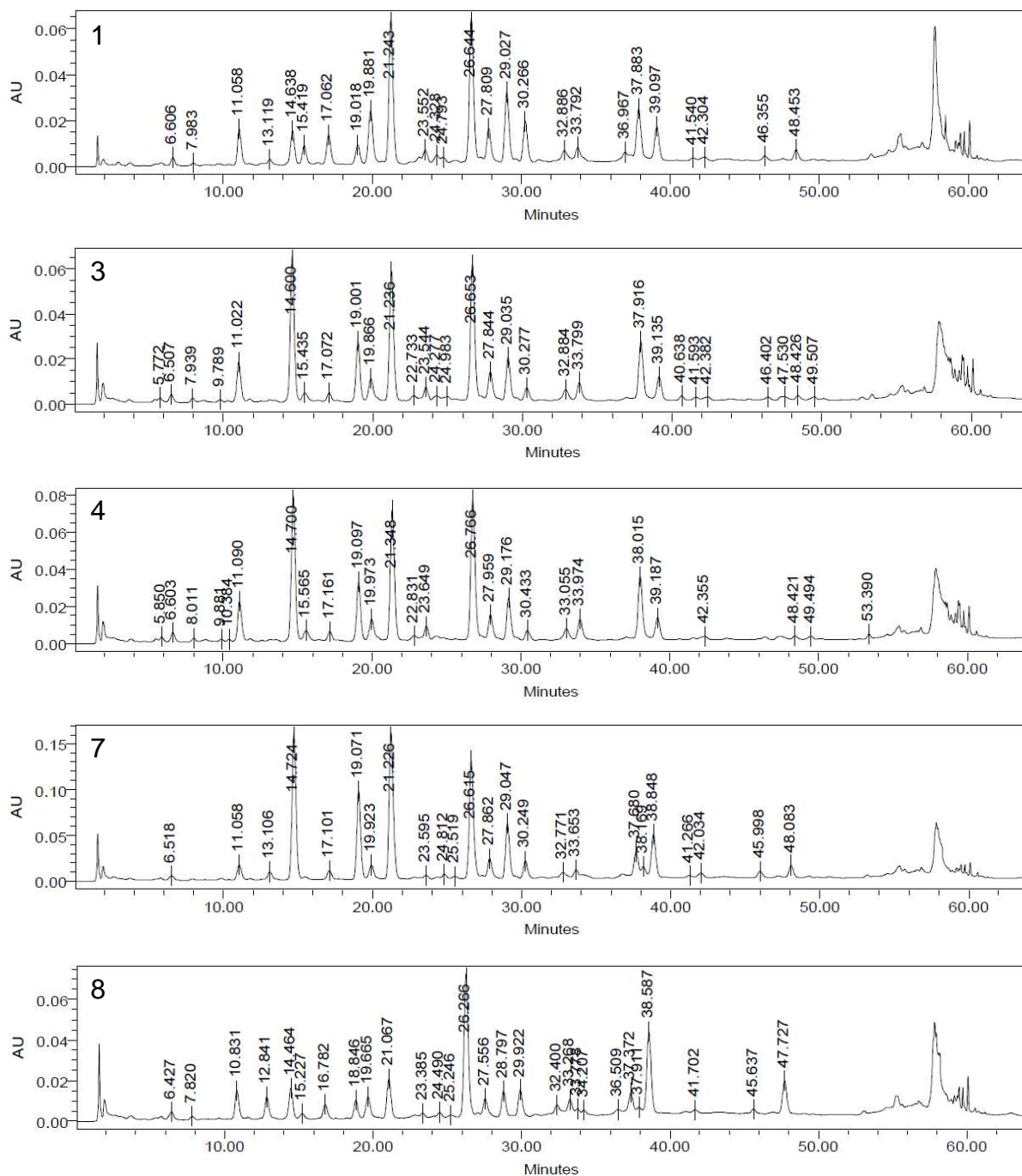
Em relação à complexidade do perfil cromatográfico, foi possível verificar que *E. arvense* apresenta um perfil mais complexo, seguido de *E. giganteum*, *E. bogotense* e *E. hyemale*. Esta última espécie, apresenta um perfil bem simples, com apenas 5 sinais de maior intensidade (Figuras 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 e 3.13).



**Figura 3.8** Cromatograma de *E. bogotense* proveniente de coleta na Argentina (amostra 10), obtido por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.

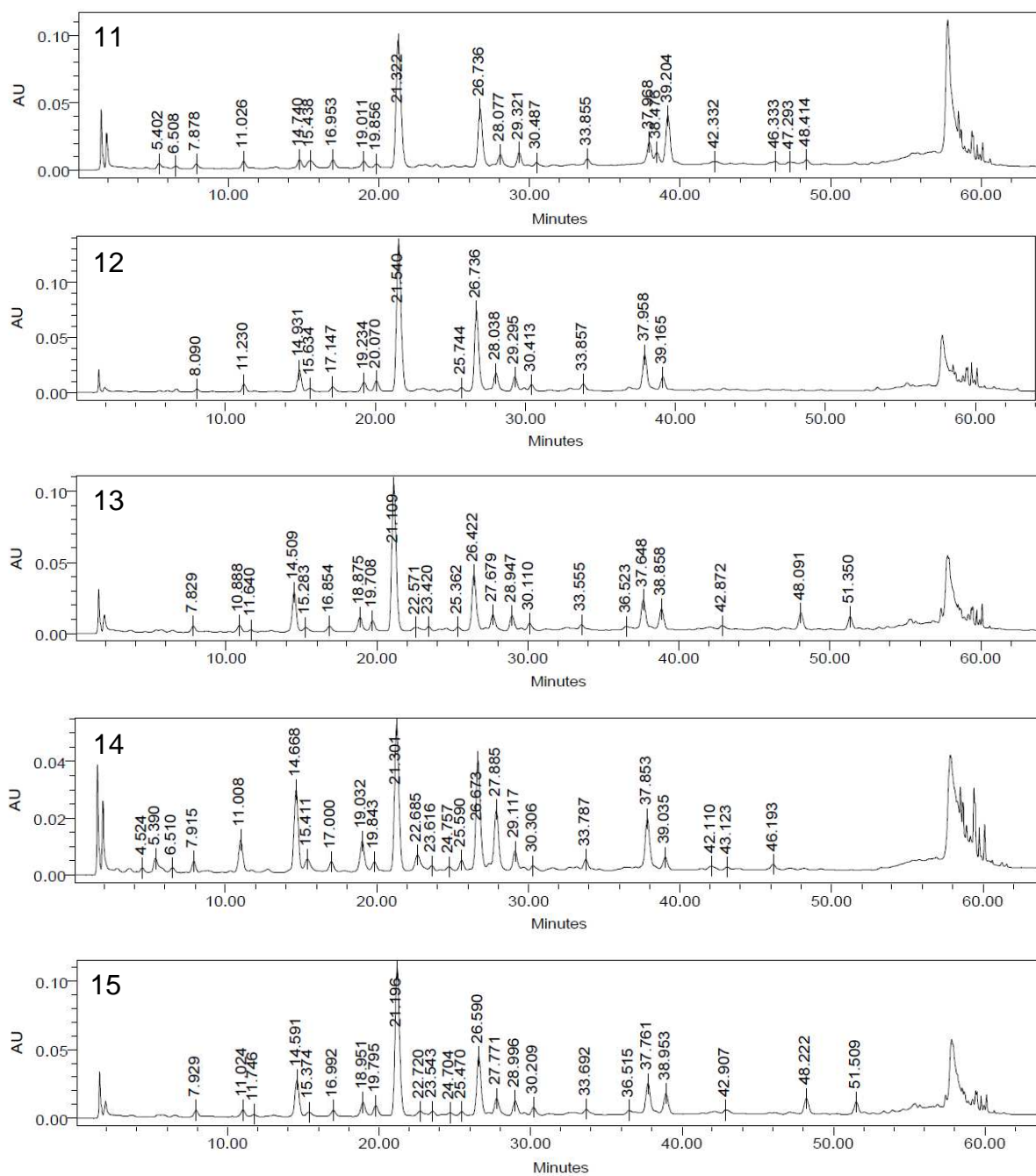


**Figura 3.9** Cromatogramas de *E. hyemale* proveniente de coleta em Mostardas/RS (amostra 19) e amostras comerciais (amostra 5 e 6), obtidos por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.

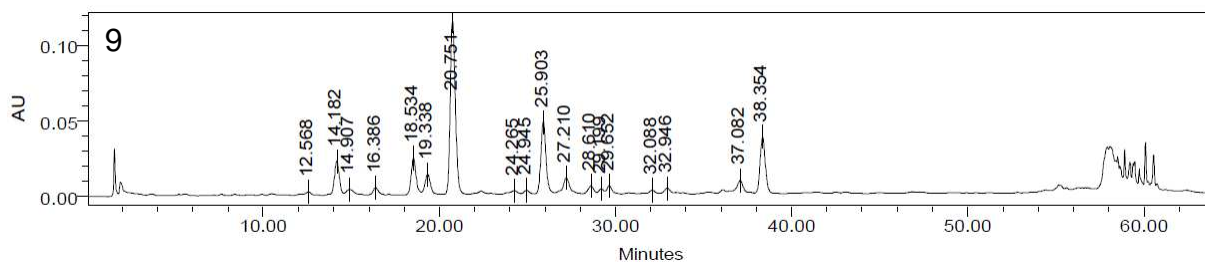


**Figura 3.10** Cromatogramas de *E. giganteum* proveniente de coleta em Santo Antônio da Patrulha/RS (amostra 1), amostras comerciais (amostra 3 e 4) e matérias-primas comercializadas no Brasil (amostra 7 e 8), obtidos por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.

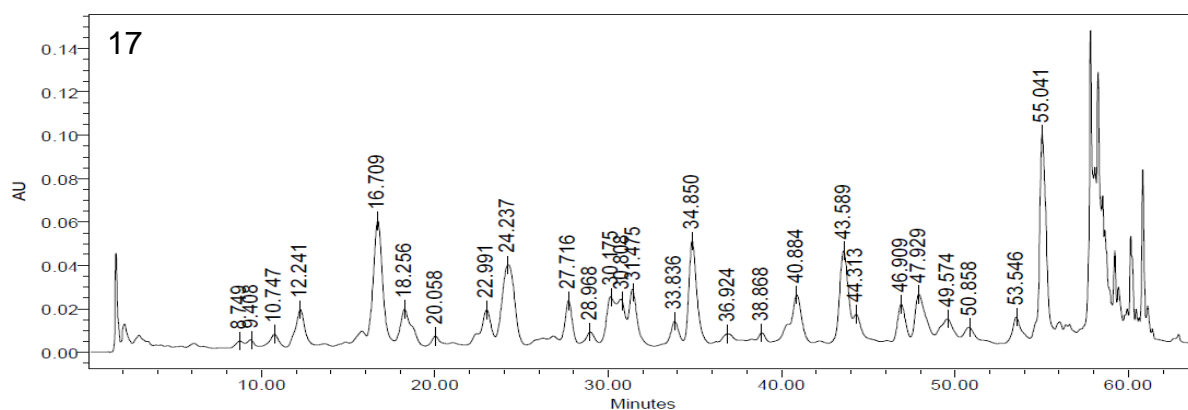




**Figura 3.11** Cromatogramas de amostras Argentinas de *E. giganteum*, amostra comercial (amostra 11) e provenientes de coletas (amostras 12, 13, 14 e 15), obtido por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.

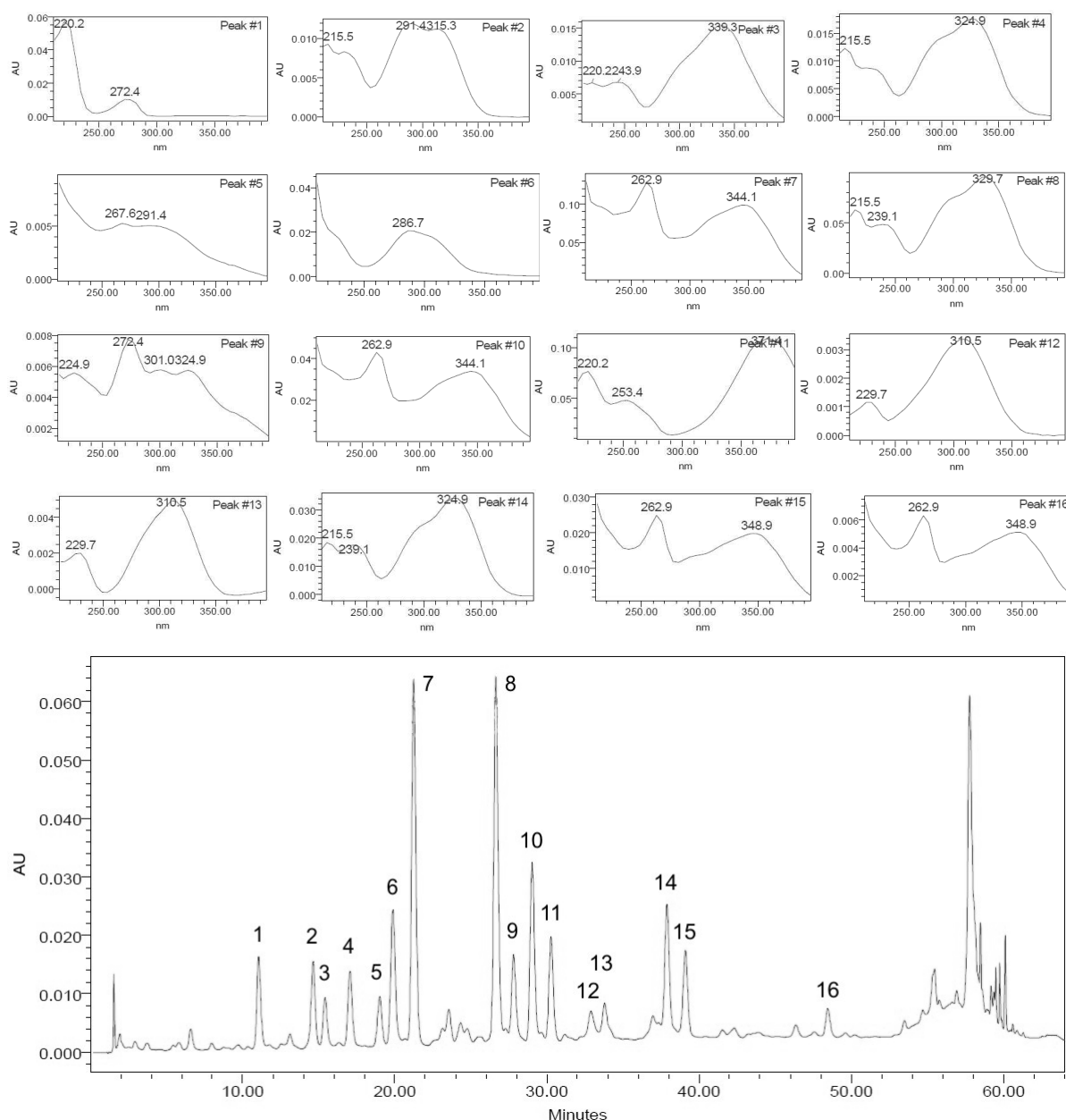


**Figura 3.12** Cromatograma de amostra comercial de *Equisetum* proveniente de Madrid/Espanha (amostra 9), obtido por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.



**Figura 3.13** Cromatograma de cápsulas contendo pó de *E. arvense* procedente da França (amostra 17), obtido por CLAE-UV a 285 nm, empregando-se o método de preparo de amostra e de análise cromatográfica descritas no item 2.7.1 Método A.

Os perfis cromatográficos obtidos para as amostras de *E. giganteum* apresentaram muita semelhança, tanto qualitativas quanto quantitativas (Figuras 3.10 e 3.11). Os cromatogramas das amostras provenientes da Argentina apresentam, em grande parte, sinais de menor intensidade, quando comparadas com as amostras brasileiras. Os principais sinais encontrados nas amostras de *E. giganteum* apresentam tempos de retenção de, aproximadamente, 14,5; 21,2; 26,7; 29 e 37,8 min. (Figura 3.10). Estes sinais referem-se ao pico 2 (UV<sub>máx.</sub> 216, 232, 291, 315 nm; UV desconhecido), pico 7 (263, 344 nm; flavonóide), pico 8 (216, 239, 330 nm; ácido fenólico), pico 10 (263, 344 nm; flavonóide), pico 14 (216, 239, 325 nm; ácido fenólico) e pico 16 (263, 349 nm; flavonóide), respectivamente, observados na Figura 3.14.



**Figura 3.14** Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de *E. giganteum* proveniente de coleta em Santo Antônio da Patrulha/RS (amostra 1), com representação do espectro de UV dos principais picos. Item 2.7.1 Método A.

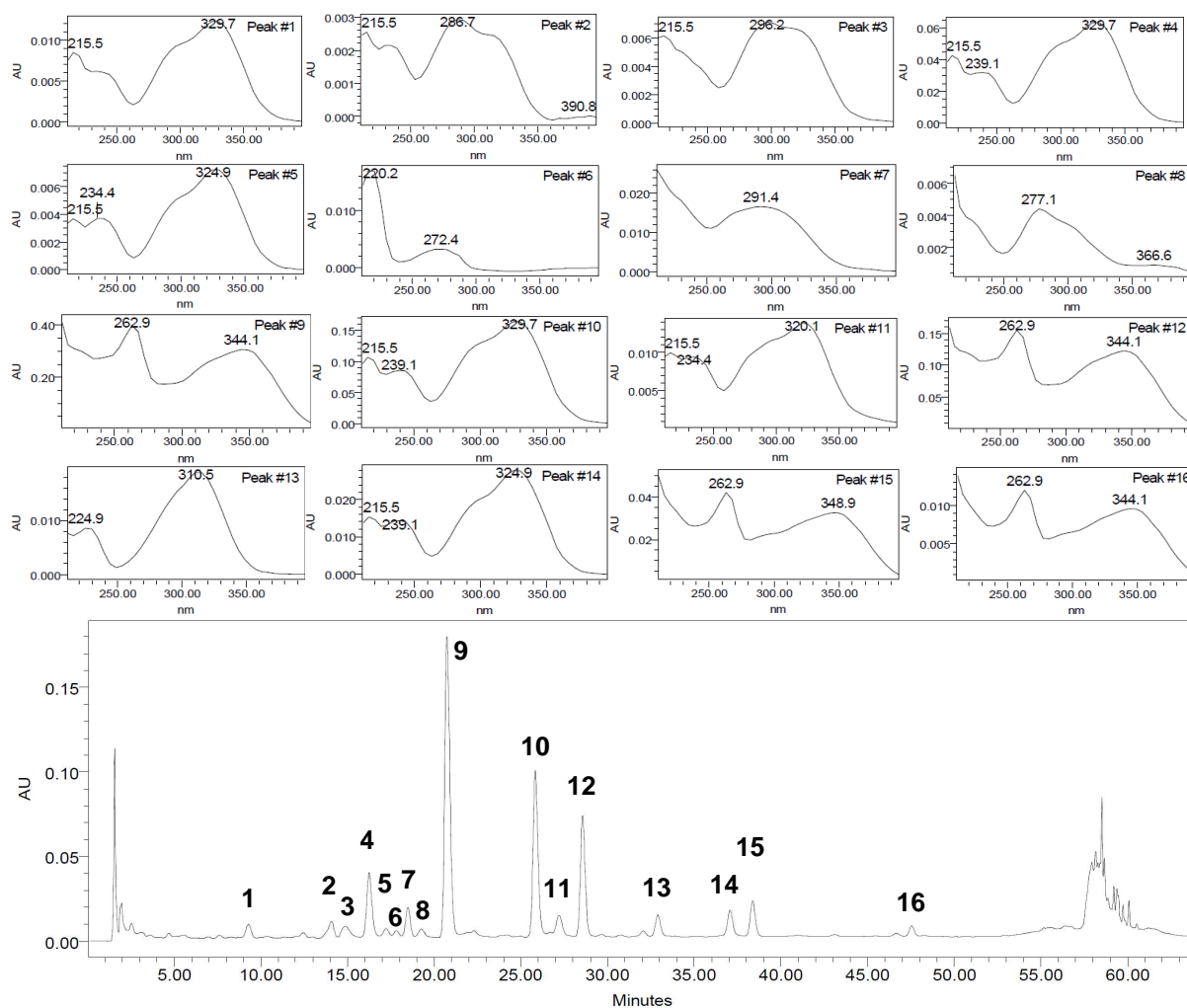
*E. bogotense* apresenta um perfil cromatográfico muito semelhante ao apresentado pelas diferentes amostras de *E. giganteum*, demonstrando a dificuldade em diferenciar quimicamente as duas espécies. Os picos 2, 4, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16 observados no cromatograma de *E. bogotense* (Figura 3.15), apresentam tempos de retenção e espectro de UV semelhantes aos picos 2, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 15 e 16 observados no cromatograma de *E. giganteum* (Figura 3.14).

Os cromatogramas de *E. hyemale* (Figura 3.9) apresentam poucos sinais, sendo que algum destes também podem ser visualizados nos cromatogramas de *E. giganteum* (Figuras 3.10 e 3.11). Os picos 2, 5, 6, 9 e 10 observados no cromatograma de *E. hyemale* (Figura 3.16), apresentam tempos de retenção e espectro de UV semelhantes ao picos 2, 7, 8, 11 e 15 observados no cromatograma de *E. giganteum* (Figura 3.14). Enquanto os picos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 observados no cromatograma de *E. hyemale* (Figura 3.16), apresentam tempos de retenção e espectro de UV semelhantes ao picos 2, 7, 8, 9, 10, 11 e 15 observados no cromatograma de *E. bogotense* (Figura 3.15).

*E. arvense* apresenta perfil qualitativo mais diferenciado, quando comparado ao das outras amostras, principalmente, um maior número de sinais com tempos de retenção superior a 40 min (Figura 3.13).

Todas as amostras, com exceção de *E. arvense* (Figura 3.13), apresentam um sinal bem intenso com tempo de retenção de, aproximadamente, 21 min. ( $UV_{máx}$ . 262,9, 344,1 nm; espectro de flavonóide heterosídico derivado do canferol). Os sinais de maior intensidade com tempos de retenção de, aproximadamente, 24,2 min e todos a partir de 40 min encontrados no cromatograma das cápsulas de *E. arvense*, são característicos desta amostra, não podendo ser visualizados ou apresentando-se com baixa intensidade nos cromatogramas das outras amostras.

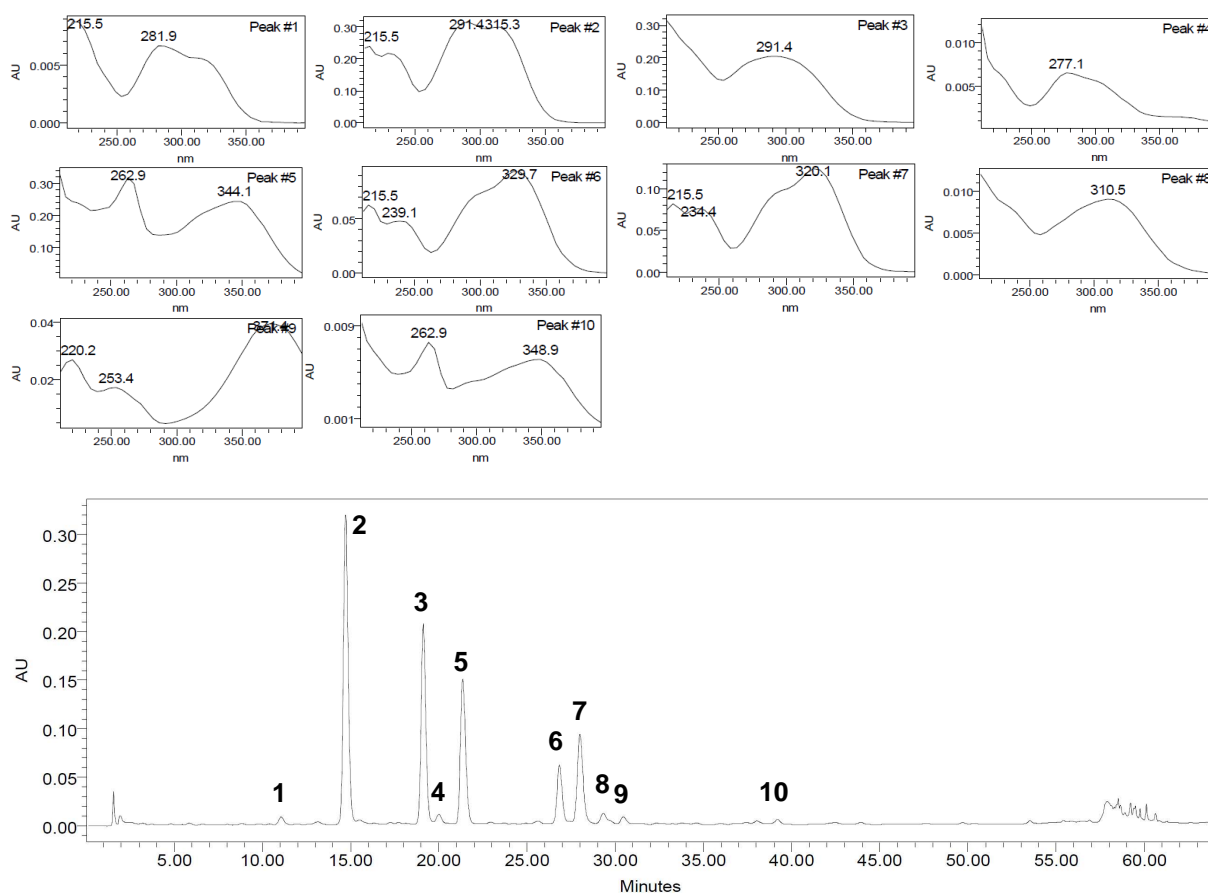
A amostra comercial proveniente de Madrid/Espanha (amostra 9, Figura 3.12) apresenta perfil cromatográfico muito semelhante aos apresentados por *E. giganteum* e *E. bogotense*, e diferente daquele apresentado por *E. arvense*, conforme já havia sido visualizado por CCD (Figura 3.7). Os sinais com tempo de retenção de aproximadamente 14,2; 16,4; 18,5; 19,3; 20,8; 25,9; 29,7; 32,9; 37,1 e 38,4 min observados no cromatograma desta amostra (Figura 3.12) apresentam espectro de UV e tempos de retenção correspondentes no cromatograma de *E. giganteum* (Figura 3.14). Desta maneira, acredita-se que esta amostra não se trate de *E. arvense*, mas sim de *E. giganteum*, já que pelas características macroscópicas também se assemelha à esta espécie.



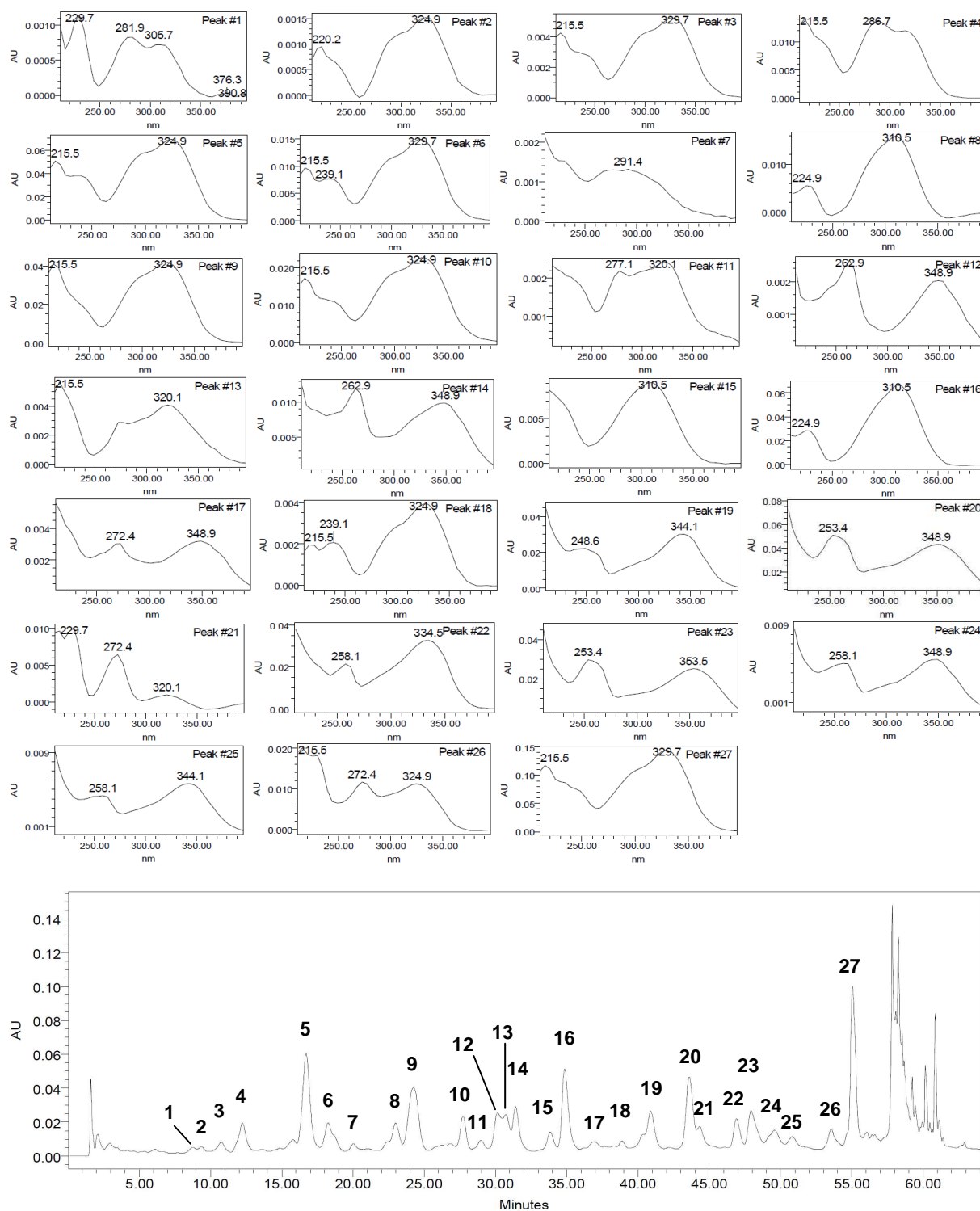
**Figura 3.15** Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de *E. bogotense* proveniente de coleta na Argentina (amostra 10), com representação do espectro de UV dos principais picos. Item 2.7.1, Método A.

As comparações entre os perfis obtidos por CLAE também demonstram que possivelmente as amostras **3** (amostra comercial rotulada como *Equisetum* sp.), **4** (amostra comercial rotulada como *E. arvense* L.), **7** (matéria-prima vegetal rotulada/identificada como *E. arvense* L.) e **8** (matéria-prima vegetal rotulada/identificada como *Equisetum* spp.), todas adquiridas em farmácias/mercados ou fornecedores de matéria-prima vegetal no Brasil, apresentam perfil cromatográfico semelhante à *E. giganteum* (Figura 3.10). Estes resultados tendem a confirmar as informações precedentes de que grande parte da matéria-prima comercializada no Brasil, algumas delas identificadas como *E.*

*arvense*, são na verdade *E. giganteum*, como ocorre na Argentina (AQUILA *et al.*, 2006; STOLIAR, 2009). Levando-se em consideração que, no Brasil, há um pequeno número de empresas fornecedoras de matéria-prima vegetais, pode-se esperar que a indústria farmacêutica nacional esteja empregando *E. giganteum* na elaboração de seus produtos. Desta maneira, avaliações de produtos alimentícios e medicamentos contendo *Equisetum* spp. precisam ser realizadas.



**Figura 3.16** Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de amostra comercial de *E. hyemale* (amostra 5), com representação do espectro de UV dos principais picos. Item 2.7.1, Método A.



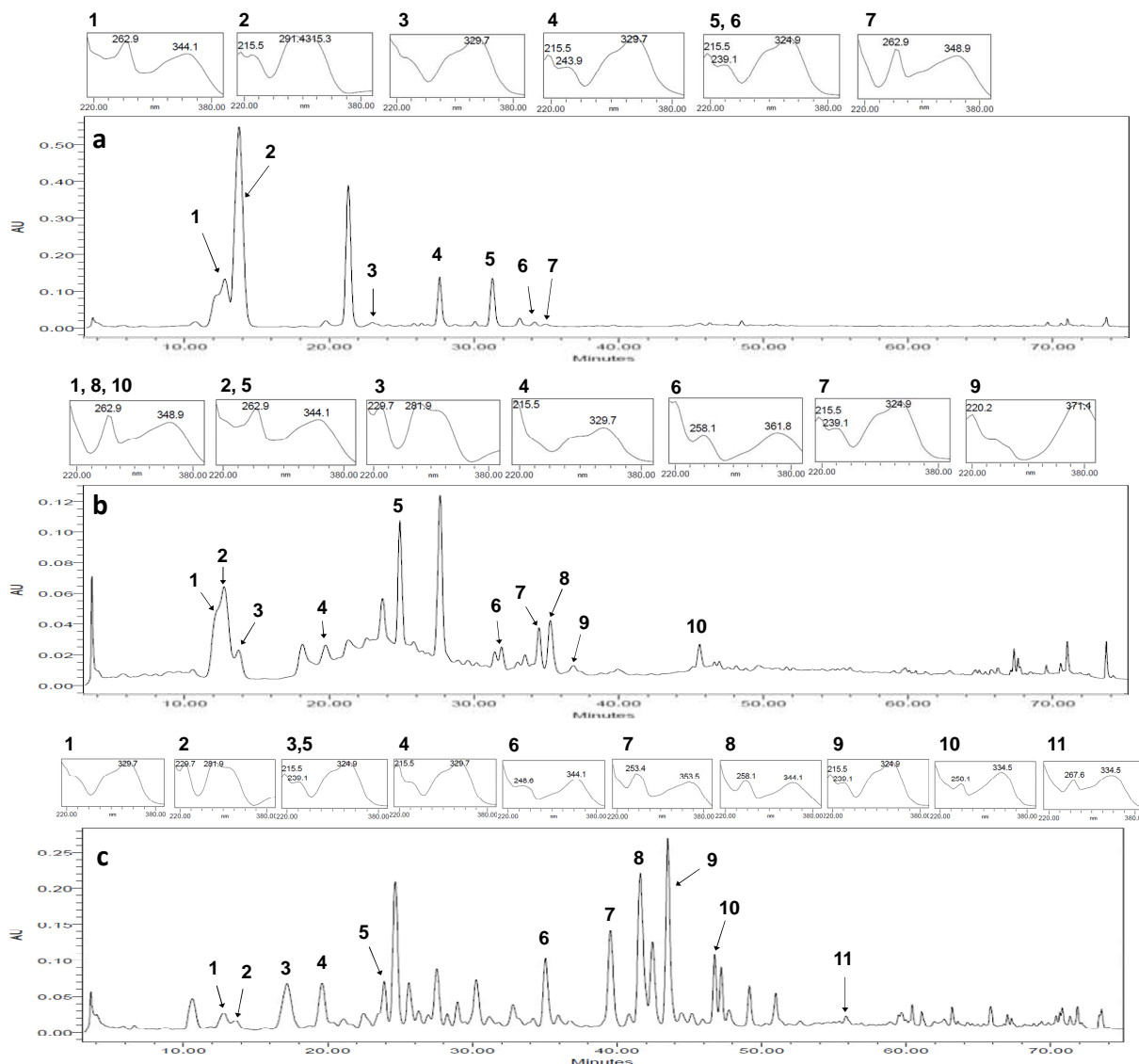
**Figura 3.17** Cromatograma a 285 nm da solução extrativa metanólica de cápsulas contendo pó de *E. arvense* procedente da França (amostra 17), com representação do espectro de UV dos principais picos. Item 2.7.1, Método A.

Na tentativa de se obter um perfil cromatográfico mais seletivo para compostos fenólicos de *Equisetum*, foi avaliada a purificação do extrato metanólico com o emprego de cartuchos de extração em fase sólida C18 (SPE-C18), conforme descrito por Veit e col. (1995b), bem como o emprego de uma coluna de maior comprimento. Os cromatogramas obtidos empregando-se este método (Método B) foram apropriados para a avaliação de compostos fenólicos em soluções extrativas metanólicas das espécies de *Equisetum* analisadas. Comparativamente, houve uma menor resolução dos sinais iniciais, mas uma melhora na sensibilidade em relação aos sinais de menor intensidade e maior resolução dos compostos menos polares, quando comparados com os cromatogramas obtidos empregando-se os parâmetros cromatográficos do Método A. Já para *E. giganteum*, o emprego do método B, promoveu um desvio na linha de base do cromatograma, se mostrando menos adequado para análises quantitativas. Pôde-se verificar a presença majoritária de compostos com espectro de UV característico de ácidos fenólicos e derivados heterosídicos de flavonóides, principalmente flavonóis, no cromatograma de *E. hyemale*, *E. giganteum* e *E. arvense* (Figura 3.18).

Nos cromatogramas apresentados na Figura 3.18 fica mais fácil avaliar as diferenças nos perfis cromatográficos de *E. hyemale*, *E. giganteum* e *E. arvense*, e verificar a semelhança entre os espectros de UV dos compostos presentes nas amostras. No cromatograma da solução extrativa purificada de *E. arvense* é possível verificar sua maior complexidade quando comparada com *E. hyemale* e *E. giganteum*, e a facilidade em distinguir estas espécies entre si pelos seus perfis cromatográficos.

A semelhança nos espectros de UV de diferentes sinais cromatográficos em uma mesma amostra indica a presença de diferentes flavonóides heterosídicos com a mesma aglicona (dois máx. de absorção no UV em, aproximadamente, 262 nm e 345 nm), e diferentes derivados do ácido hidroxicinâmico (máx. de UV em, aproximadamente, 329 nm).





**Figura 3.18** Cromatogramas comparativos de soluções extrativas metanólicas purificadas de *E. hyemale* (a), *E. giganteum* (b) e *E. arvense* (c), a 280 nm. Método B. Espectro de UV (210-400 nm) dos sinais característicos de ácido fenólicos e flavonóides. Item 2.7.2, Método B.

A determinação quantitativa deste tipo de compostos de maneira individual no material vegetal se torna difícil e trabalhosa, principalmente em relação aos flavonóides heterosídicos devido ao seu grande número ou porque grande parte dos compostos de referência não estão disponíveis comercialmente. Desta maneira, estes heterosídeos podem ser hidrolisados e as agliconas resultantes podem ser facilmente identificadas e quantificadas por CLAE-UV (HERTOG *et al.*, 1992).

### 3.6 Avaliação preliminar por CLAE dos processos extrativos em *E. giganteum*

Com o objetivo de buscar um processo extrativo capaz de fornecer um perfil cromatográfico reproduzível, tanto qualitativo quanto quantitativo, e extrair maior quantidade dos compostos fenólicos presentes em *E. giganteum*, foram avaliados os métodos extrativos: sonicação por 30 min, agitação por 60 min, ambos a temperatura ambiente, e agitação à 60 °C por 15 min; e os líquidos extratores: água destilada, etanol (nas concentrações de 100, 80 e 50%, v/v) e metanol (nas concentrações de 100, 80 e 50%, v/v). Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8.

**Tabela 3.6** Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de *E. giganteum* (amostra 1), obtida por sonicação durante 30 min a 25 °C, empregando diferentes líquidos extratores. Área dos picos expressa em unidades de absorvância (UA).

UV máx (nm)	TR aprox. (min)	sonicação durante 30 min a 25 °C (UA)						
		Água	Etanol	Etanol 80%	Etanol 50%	Metanol	Metanol 80% <sup>b</sup>	Metanol 50%
253, 354	9,6	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	51.729
263, 349*	10,3	-	69.937	475.131	-	-	-	-
263, 349*	12,5	1.238.469	93.541	394.810	1.332.175	616.302	477.077	1.323.919
215, 291	13,5	-	-	-	-	-	-	69.201
234, 287, 315	14,5	172.079	-	-	120.384	-	-	-
220, 272, 362	18,9	490.125	-	401.120	532.107	81.800	142.968	531.612
220, 329**	20,7	509.830	-	151.260	429.454	-	-	409.248
291	21,9	57.041	-	-	99.400	-	-	59.000
277	23,3	-	-	-	55.233	-	-	-
220, 320**	23,9	55.210	-	63.635	106.118	-	-	59.014
220, 272, 324	24,2	76.096	65.857	71.417	118.152	108.899	-	88.548
220, 282, 315	24,7	-	-	-	88.006	-	-	80.310
263, 344*	25,4	219.310	152.809	354.727	401.438	293.346	182.496	364.751
215, 315	26,7	72.553	-	-	85.927	-	-	54.579
248, 371	28 <sup>a</sup>	-	90.465	-	-	354.056	-	-
220, 330**	28 <sup>a</sup>	1.472.555	-	1.040.240	1.482.001	-	466.831	1.534.870
239, 325	31,8	65.432	-	-	-	-	-	-
225, 315	34,7	253.922	-	179.638	225.442	-	68.628	240.190
215, 330**	35,9	456.688	-	325.091	431.355	86.069	127.553	448.397
263, 349*	36,6	248.018	75.269	248.730	269.980	128.555	110.163	260.370
263, 349*	47,6	55.993	-	93.333	-	-	-	79.457
287, 344	48	62.897	-	-	-	-	-	-

\* espectro de UV característico de flavonóide (derivados do canferol). \*\* espectro de UV característico de ácido fenólico (hidroxicinâmico)

<sup>a</sup> existe a co-eluição de dois compostos no pico com tempo de retenção de 28 min, dependendo do solvente um composto é seletivamente extraído e o pico apresenta seu espectro de UV. <sup>b</sup> provavelmente ocorreu um erro durante a execução, tornando os valores não confiáveis. <sup>c</sup> sinal com área inferior a 50.000 AU ou não integrado

**Tabela 3.7** Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de *E. giganteum* (amostra 1), obtida por extração sob agitação durante 60 min a 25 °C, empregando diferentes líquidos extratores. Área dos picos expressa em unidades de absorbância (UA).

UV máx. (nm)	TR aprox. (min)	agitação durante 60 min a 25 °C (UA)						
		Água	Etanol	Etanol 80%	Etanol 50%	Metanol	Metanol 80%	Metanol 50%
253, 354	9,6	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	83.146
263, 349*	10,3	-	87.606	212.966	-	-	-	-
263, 349*	12,5	1.004.861	110.486	487.871	1.348.277	680.339	1.233.951	1.367.404
215, 291	13,5	-	-	-	-	-	-	-
234, 287, 315	14,5	59.098	-	92.504	160.409	-	170.726	174.101
220, 272, 362	18,9	495.814	-	368.657	451.918	65.197	457.732	545.888
220, 329**	20,7	446.784	-	100.105	373.930	-	113.704	366.990
291	21,9	-	-	-	53.692	-	63.610	54.401
277	23,3	-	-	-	-	-	-	-
220, 320**	23,9	64.386	-	64.427	-	-	-	55.850
220, 272, 324	24,2	-	-	70.328	76.450	127.388	88.885	50.585
220, 282, 315	24,7	84.072	-	-	49.880	-	-	103.436
263, 344*	25,4	151.520	162.027	416.688	403.261	297.976	421.258	379.877
215, 315	26,7	101.405	-	-	53.214	-	-	76.803
248, 371	28 <sup>a</sup>	-	98.951	-	-	403.434	-	-
220, 330**	28 <sup>a</sup>	1.270.531	-	1.062.628	1.458.854	-	1.232.376	1.502.408
239, 325	31,8	-	-	-	-	-	-	-
225, 315	34,7	282.240	-	178.548	213.401	-	193.892	228.554
215, 330**	35,9	408.303	85.778	331.800	418.285	82.234	351.995	419.864
263, 349*	36,6	238.065	-	262.536	254.267	130.794	262.531	260.502
263, 349*	47,6	-	-	85.134	84.934	-	84.601	74.238
287, 344	48	-	-	-	-	-	-	-

\* espectro de UV característico de flavonóide (derivados do canferol). \*\* espectro de UV característico de ácido fenólico (hidroxicinâmico)

<sup>a</sup> existe a co-eluição de dois compostos no pico com tempo de retenção de 28 min, dependendo do solvente um composto é seletivamente extraído e o pico apresenta seu espectro de UV. <sup>b</sup> sinal com área inferior a 50.000 AU ou não integrado

Só foram considerados para a análise comparativa dos dados, os sinais que apresentaram área superior a 50.000 UA com tempos de retenção entre 5 e 50 min, que corresponde à faixa do cromatograma onde *E. giganteum* apresenta os sinais mais relevantes à sua identificação. A parte inicial e final do cromatograma não puderam ser consideradas já que estas regiões estão mais suscetíveis a variações nos tempos de retenção, dificultando a distinção dos compostos devido à baixa resolução dos sinais e semelhanças nos espectros de UV. Na região selecionada do cromatograma, devido ao grande número de sinais, que pode chegar até 28 sob certas condições de extração, apenas aqueles com maiores áreas foram selecionados para a comparação.

**Tabela 3.8** Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos presentes na solução extrativa de *E. giganteum* (amostra 1), obtida por extração sob agitação durante 15 min a 60 °C, empregando diferentes líquidos extratores. Área dos picos expressa em unidades de absorbância (UA).

UV máx. (nm)	TR aprox. (min)	agitação durante 15 min a 60 °C (UA)						
		Água	Etanol	Etanol 80%	Etanol 50%	Metanol	Metanol 80%	Metanol 50%
253, 354	9,6	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	56.414	86.308
263, 349*	10,3	63.611	140.977	587.066	-	-	-	-
263, 349*	12,5	1.022.384	146.837	673.074	1.151.030	845.606	1.328.252	1.346.180
215, 291	13,5	-	-	116.343	139.752	126.521	176.150	161.848
234, 287, 315	14,5	153.844	-	-	-	-	-	-
220, 272, 362	18,9	390.973	-	393.003	424.136	67.810	403.918	517.560
220, 329**	20,7	440.993	-	136.279	360.523	-	130.337	381.648
291	21,9	-	-	-	-	-	-	-
277	23,3	-	294.315	-	-	-	-	-
220, 320**	23,9	-	-	-	-	71.071	-	-
220, 272, 324	24,2	-	112.411	119.595	92.435	161.614	128.713	100.444
220, 282, 315	24,7	70.279	-	-	-	-	-	58.073
263, 344*	25,4	256.783	264.116	466.393	379.026	367.879	470.942	421.907
215, 315	26,7	63.541	-	-	60.184	-	-	63.291
248, 371	28 <sup>a</sup>	-	152.139	-	-	523.846	-	-
220, 330**	28 <sup>a</sup>	1.316.467	-	1.206.151	1.346.362	-	1.319.749	1.513.341
239, 325	31,8	-	-	58.619	-	-	52.520	-
225, 315	34,7	224.201	-	201.073	198.720	65.357	205.316	223.674
215, 330**	35,9	400.799	-	358.427	368.665	130.906	375.758	411.654
263, 349*	36,6	260.161	113.962	259.840	226.553	169.322	261.219	243.978
263, 349*	47,6	74.622	-	101.376	112.276	61.531	95.283	93.435
287, 344	48	-	-	-	53.225	-	-	60.825

\* espectro de UV característico de flavonóide (derivados do canferol). \*\* espectro de UV característico de ácido fenólico (hidroxicinâmico)

<sup>a</sup> existe a co-eluição de dois compostos no pico com tempo de retenção de 28 min, dependendo do solvente um composto é seletivamente extraído e o pico apresenta seu espectro de UV. <sup>b</sup> sinal com área inferior a 50.000 AU ou não integrado

Ao avaliar comparativamente os diferentes líquidos extratores, podemos verificar perfis cromatográficos com melhores resultados quali/quantitativos quando água, etanol (80 e 50%) e metanol (50%) são empregados (Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8). A extração por sonicação empregando metanol 80%, possivelmente teve os resultados afetados por erro metodológico.

As extrações empregando água como líquido extrator, quando comparado as diferentes proporções de etanol e metanol, foram aquelas que apresentaram maiores problemas durante o processo de filtração. A obtenção de uma solução extrativa turva levou a uma rápida saturação da membrana (0,45 µm), dificultando o processo de filtração, e inviabilizando a análise de um grande número de amostras.

O emprego de etanol e metanol (ambos a 100%), além de levar a uma extração com baixos rendimentos quantitativos, gera cromatogramas com uma elevação na linha de base, o que afeta consideravelmente a integração dos sinais e assim análises quantitativas. Enquanto que, o emprego de etanol 100 e 80% como líquido extrator nos três métodos de extração conduziu a uma diminuição na intensidade do pico com tempo de retenção de, aproximadamente, 12,5 min (com UV característico de derivado heterosídico do canferol) e o surgimento de outro pico com o mesmo espectro de UV e menor tempo de retenção, em aproximadamente 10,3 min (Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8). Isto também ocorre, mas em menores proporções, quando se utiliza água, etanol 50% e metanol como líquidos extratores no método com aquecimento. Uma explicação plausível para este fato seria a isomerização dos açúcares ligados à aglicona (por exemplo, isomerização de glicose à frutose) (ROMÁN-LESHKOV *et al.*, 2010), a oxidação dos grupamentos  $-CH_2OH$  destes açúcares em grupos  $-COOH$ , ou ainda, a redução do açúcar terminal da cadeia heterosídica, com abertura do anel, alterações que podem provocar um aumento na polaridade destes heterosídeos sem afetar seu espectro de UV. Desta maneira, o emprego de aquecimento durante a extração do material vegetal com metanol ou etanol, pode conduzir à formação de artefatos e dificultar a diferenciação química das espécies, sendo assim desaconselhável seu emprego neste tipo de análise.

Entre os métodos extrativos avaliados, a agitação durante 15 min a 60 °C, apesar de apresentar bons resultados quantitativos, não apresentou um perfil cromatográfico qualitativo adequado. Assim, os melhores resultados foram obtidos empregando os métodos extrativos agitação por 60 min e sonicação por 30 min, utilizando com líquido extrator etanol e metanol, ambos na concentração de 50%.

Considerando os problemas apresentados, a facilidade e o tempo de execução, o processo extrativo selecionado foi aquele empregando sonicação durante 30 min e etanol 50% (v/v) como líquido extrator (relação droga:solvente de 1:20, m/v). Este processo forneceu os melhores resultados qualitativos e quantitativos, principalmente para os picos de maior área. Os picos de menor área foram menos afetados pela alteração do solvente quando se empregou a extração por sonicação, mostrando que o uso deste método de extração é adequado em análises qualitativas.

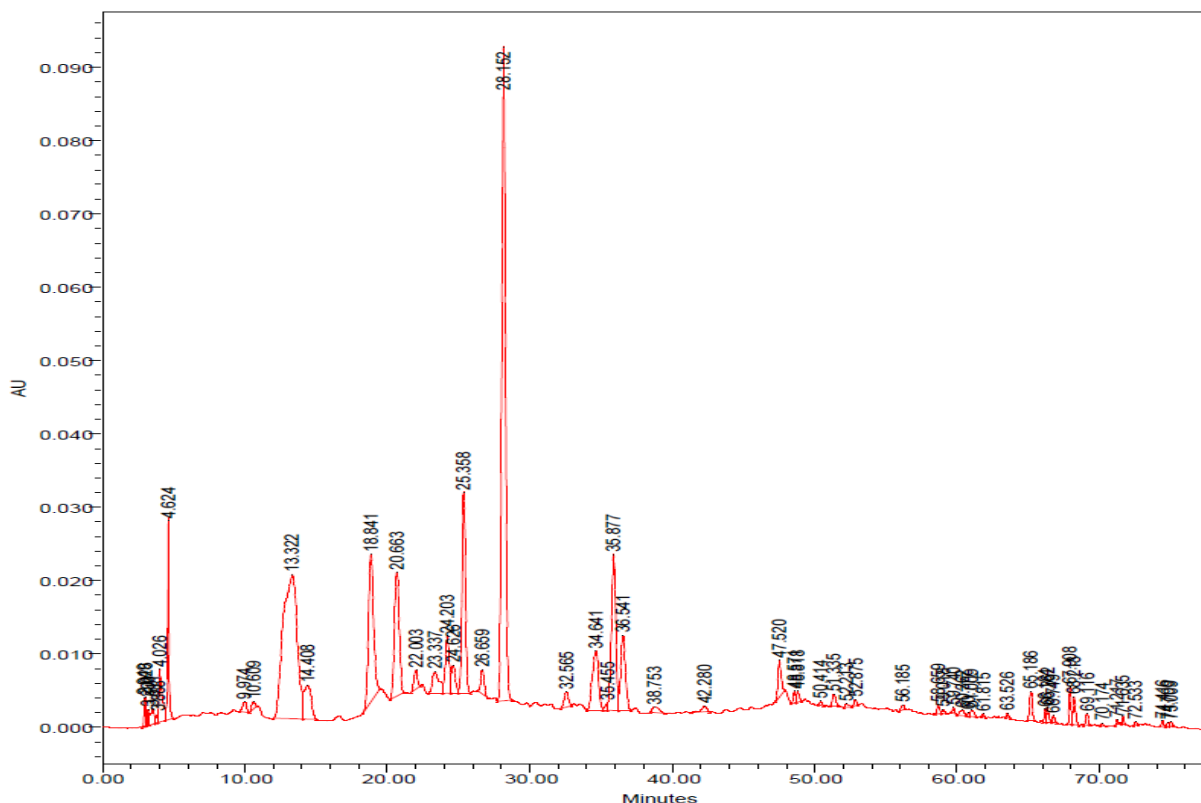
Os resultados obtidos a partir de três determinações empregando o método selecionado estão apresentados na Tabela 3.9 e o cromatograma desta solução extrativa pode ser visualizado na Figura 3.19. Os resultados demonstram boa repetibilidade nas áreas dos principais picos cromatográficos, com desvio-padrão relativo abaixo de 5%.

**Tabela 3.9** Dados espectroscópicos e cromatográficos dos principais picos (área do pico superior a 50.000 AU) presentes na solução extrativa de *E. giganteum* (amostra 1), obtida por extração empregando-se sonicação durante 30 min e etanol 50% (v/v) como líquido extrator. Os resultados representam a média de três determinações.

UV máx (nm)	TR (min)	DP (min)	DPR (%)	ÁREA (UA)	DP (AU)	DPR (%)
<b>263, 344*</b>	13,394	0,063	0,5	1.359.115	17.313	1,3
234, 287, 315	14,456	0,044	0,3	162.833	5.228	3,2
225, 272	18,887	0,040	0,2	507.514	5.289	1,0
<b>220, 329**</b>	20,711	0,046	0,2	392.063	4.348	1,1
<b>220, 320**</b>	23,386	0,043	0,2	103.743	2.327	2,2
220, 272, 324	24,246	0,037	0,2	154.550	1.615	1,0
220, 282, 315	24,657	0,031	0,1	71.316	1.177	1,7
<b>263, 344*</b>	25,399	0,036	0,1	467.330	7.463	1,6
234, 315	26,700	0,046	0,2	56.445	1.602	2,8
<b>220, 330**</b>	28,191	0,039	0,1	1.607.089	19.824	1,2
225, 315	34,663	0,035	0,1	240.988	1.758	0,7
<b>215, 330**</b>	35,896	0,032	0,1	444.991	3.243	0,7
<b>263, 349*</b>	36,564	0,020	0,1	247.221	5.900	2,4
<b>263, 349*</b>	47,554	0,036	0,1	76.144	3.454	4,5
220, 282, 353	65,163	0,046	0,1	52.231	1.010	1,9

\* espectro de UV característico de flavonóide (derivados do canferol)

\*\* espectro de UV característico de ácido fenólico (hidroxicinâmico)



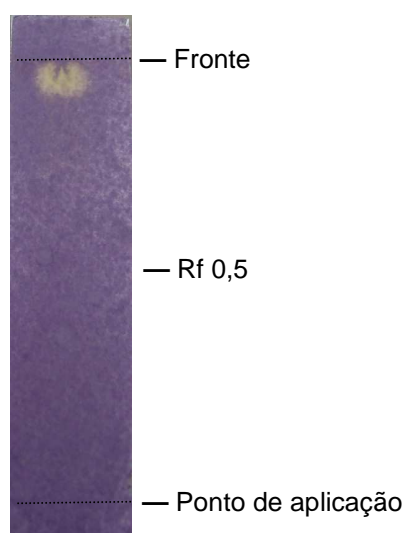
**Figura 3.19** Cromatograma a 280 nm da solução extrativa de *E. giganteum* (amostra 1), obtida através de extração por sonicação durante 30 min, empregando-se etanol 50% como líquido extrator. Integração automática.

### 3.7 Atividade Capturadora de Radicais Livres

A propriedade capturadora de radicais livres do extrato metanólico de *E. giganteum* foi avaliada por autografia com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>).

O radical DPPH<sup>•</sup> (cor violeta, no visível), é um radical estável, mas que, ao sofrer redução, por parte de substâncias doadoras de hidrogênio ou elétrons, passa a apresentar cor amarelada. Por sua estabilidade e simples manipulação, e por prestar-se facilmente para detectar a reação de terminação de radical, devido à mudança de cor, o radical DPPH<sup>•</sup> tem sido amplamente utilizado para estudo monitorado por autografia e quantificação do potencial de captação de radicais livres de extratos, frações e substâncias isoladas de plantas medicinais (BRACA *et al.*, 2002).

Neste ensaio, o cromatograma obtido a partir do extrato metanólico de *E. giganteum*, apresentou apenas uma mancha ( $R_f \sim 0,96$ ) com alta atividade capturadora de radical DPPH<sup>•</sup>, visível pela sua rápida descoloração e estabilidade durante o tempo (Figura 3.20). Esta mancha, pelo seu elevado  $R_f$ , representa um ou mais compostos com características relativamente mais apolares daqueles presentes no extrato, possivelmente compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e/ou agliconas de flavonóides. O  $R_f$  e a coloração apresentados por esta mancha é semelhante ao das substâncias de referência ácido caféico e ácido ferúlico (WAGNER, BLADT, 1996, p. 210-211), compostos com reconhecida atividade antioxidante e captadora de radicais livres (MAURYA, DEVASAGAYAM, 2010).



**Figura 3.20** Perfil cromatográfico do extrato metanólico de *E. giganteum* após nebulização com solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> a 0,2%. Fase móvel: ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v).



## 4 CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados obtidos neste capítulo podemos concluir que:

- o alcalóide nicotina não pôde ser encontrado nas amostras analisadas, como esperado, a partir de relatos na literatura para outras espécies do gênero. Os únicos compostos com reação positiva para o reagente Dragendorf encontrados apresentaram características cromatográficas semelhantes à tiamina;
- a avaliação qualitativa das frações de alcalóides totais não se mostrou relevante ou conclusiva na diferenciação das espécies analisadas;
- o emprego das técnicas cromatográficas CCD e CLAE, permitiu traçar o perfil de metabólitos secundários das espécies *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. bogotense* e *E. hyemale*;
- os perfis cromatográficos obtidos se mostraram relevantes e permitiram a diferenciação qualitativa das espécies, apesar da dificuldade em se obter um marcador específico para cada uma;
- a isoquercitrina demonstrou ser marcador específico para *E. arvense*, subsidiando critérios químicos que permitem diferenciá-la das outras espécies analisadas;
- os perfis cromatográficos obtidos por CCD e CLAE demonstram que, possivelmente, algumas amostras rasuradas comercializadas como *E. arvense* e *Equisetum* sp. no Brasil, e como “Cola de Caballo” na Espanha, na verdade se tratem de *E. giganteum*;
- preliminarmente, pôde ser escolhido o processo extrativo mais adequado para a avaliação do perfil cromatográfico de *E. giganteum* por CLAE: emprego de etanol 50% (v/v) como líquido extrator (relação droga:solvente de 1:20, m/v) sob sonicação, durante 30 min;
- estes experimentos constituem uma das primeiras contribuições para o estabelecimento de parâmetros para a caracterização e o controle de qualidade das partes aéreas de *E. giganteum*.



**CAPÍTULO 4**

**Manuscrito: CHARACTERIZATION OF COMMON AND  
RARE PHENOLICS PRESENTS IN *Equisetum giganteum*  
BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETRY  
(LC-MS/MS) AND A NEW APPROACH OF  
TOTAL FLAVONOID SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY  
IN HORSETAIL (*Equisetum* spp.)**

---



**CHARACTERIZATION OF COMMON AND RARE PHENOLICS PRESENTS IN  
*Equisetum giganteum* BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS  
SPECTROMETRY (LC-MS/MS) AND A NEW APPROACH OF TOTAL FLAVONOID  
SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY IN HORSETAIL (*Equisetum* spp.)**

Leandro N. Francescato <sup>a,\*</sup>, Thiago G. Schwanz <sup>b</sup>, Valquiria L. Bassani <sup>a</sup>,  
Amélia T. Henriques <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas – NAPO, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

**Abstract:** *Equisetum giganteum* L., commonly named “giant-horsetail”, is an endemic species of Latin America. Aerial parts from it are widely used as raw material for herbal medicines, mainly as diuretic. The phenolic composition of *E. giganteum* stems were analyzed by LC-DAD and LC-ESI-MS/MS. Some rare hydroxycinnamic acid esters, not previously reported in the genus, along with styrylpyrones glycosides, and kaempferol and quercetin glycosides were identified. The flavonoid aglycones in *E. giganteum* were analyzed after hydrolysis optimization by Central Composite Rotational Design (CCRD) and Response Surface Analysis. A new validated method of quantification of total flavonoids employing LC-UV were developed and compared with the pharmacopoeic method described for Horsetail in British Pharmacopoeia 2011. Genuine samples from four *Equisetum* species: *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. hyemale* and *E. bogotense* were evaluated. *E. arvense* present the most distinct profile of aglycones, both qualitatively and quantitatively. The results presented in this paper are useful and decisive in the differentiation of species analyzed, and also in contribute for quality control of the *E. giganteum* raw material.

**Keywords:** *Equisetum giganteum*, hydroxycinnamic acid, styrylpyrones, flavonoids, LC-MS/MS, aglycones, total flavonoid determination

**CAPÍTULO 5**

**Manuscrito - *Equisetum giganteum* L.: DEVELOPMENT AND  
CHARACTERIZATION OF SPRAY-DRIED POWDER**

---



## ***Equisetum giganteum* L.: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF SPRAY-DRIED POWDER**

Leandro N. FRANCESCATO <sup>1,2,\*</sup>, Francini K. J. YATSU <sup>2</sup>, Amélia T. HENRIQUES <sup>1</sup>,  
Valquiria L. BASSANI <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de Farmacognosia*, <sup>2</sup> *Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* leandrofrancescato@yahoo.com.br

**SUMMARY.** The present work reports the development of a spray-dried extract (SDE) in semi-industrial scale without use of drying adjuvant, from aqueous extractive solution (AES) of *E. giganteum*, a species with medicinal use in Latin America. The SDE had their chemical, physico-chemical and technological properties characterized; the mineral content was determined and the phenolic profile evaluated by LC-DAD and LC-MS. The yield of the spray drying process was excellent (85.6%), considering the low dry residue of AES ( $1.54 \pm 0.00\%$ , w/v) and the absence of drying adjuvants, demonstrating the feasibility of manufacturing. The SDE presented hygroscopic behavior, with the Carr's index and the Hausner's ratio indicating low flowability of the product. However, a low water activity was observed ( $0.348 \pm 0.003$ ), contributing to the chemical and microbiological stability of the product. The high content of reducing sugars and minerals present can explain some of these SDE characteristics, and also corroborate the traditional use of the aqueous infusion or decoction of the plant as remineralizant, anti-diarrheal and antidyenteric. The spray drying process did not result in any alteration in phenolic profile when compared to freeze drying process. The chromatographic analysis indicated the presence of kaempferol and hydroxycinnamic acid derivatives as prevalent metabolites.

**KEYWORDS:** *Equisetum giganteum*, spray-drying, characterization, remineralizant, LC-MS





**DISCUSSÃO GERAL**

---



A revisão do tema, envolvendo o gênero *Equisetum*, com ênfase na espécie *E. giganteum*, revela que existem graves problemas de identificação botânica e delimitação entre as espécies do gênero, os quais podem resultar tanto em equívocos no uso tradicional quanto, em estudos científicos.

*E. giganteum*, planta considerada nativa do Brasil (SALINO, ALMEIDA, 2012), é tradicionalmente empregada na América Latina no tratamento de transtornos urinários e hepáticos, mas principalmente como diurética, na forma de decocto e infuso. No Brasil, a droga vegetal e derivados de *Equisetum* spp., entre eles *E. giganteum*, são também comercializados (em farmácias, mercados e ervanarias) e popularmente indicados para a perda de peso. Este uso não apresenta qualquer comprovação científica e possivelmente está baseado no efeito diurético associado ao gênero. Os usos medicinais do gênero *Equisetum* são amplamente baseados na tradicionalidade, apresentando poucas comprovações clínicas em humanos.

Apesar do antigo e amplo uso medicinal de *E. giganteum*, poucos são os estudos científicos envolvendo esta espécie, enquanto que um maior número de estudos abordando as espécies do subgênero *Equisetum* podem ser encontrados, principalmente daquelas espécies encontradas na Europa, como *E. arvense*.

Até o momento, as principais atividades biológicas exploradas para o gênero são antimicrobiana, hipoglicêmica e diurética, muitas delas avaliadas *in vivo*, e tentando corroborar o uso tradicional. Alguns autores acreditam que os compostos responsáveis por estas atividades sejam os flavonóides, classe de compostos amplamente relatada no gênero.

Com relação aos ensaios toxicológicos, os estudos encontrados demonstram uma baixa toxicidade para o gênero, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que está de acordo com o elevado número de trabalhos etnobotânicos sem o relato de efeitos adversos e tóxicos. Os únicos relatos de toxicidade estão associados ao consumo de grandes quantidades das partes aéreas da planta por eqüinos e bovinos (ALVIN-CARNEIRO, 1948; AL-QURA'N, 2005; LORENZI, MATOS, 2008), o que não acontece com humanos, onde apenas derivados são empregados. Entretanto, *E. palustre*, por possuir o alcalóide palustrina, é uma espécie que apresenta potencial

de toxicidade (KARRER, EUGSTER, 1948), apesar de nenhum efeito deste tipo ter sido relatado em humanos.

A partir desta revisão, pode-se verificar a importância medicinal e comercial de *E. giganteum*, tornando-se evidente a necessidade de caracterizar e avaliar parâmetros de controle de qualidade para a droga vegetal, bem como estabelecer critérios químicos que permitam diferenciá-la de outras espécies do gênero.

As espécies avaliadas comparativamente à *E. giganteum* neste trabalho foram *E. arvense*, *E. hyemale* e *E. bogotense*. A escolha destas espécies foi primeiramente baseada na disponibilidade de amostras e na importância de cada uma delas: *E. arvense* por se tratar da espécie farmacopêica “referência”, da qual *E. giganteum* é utilizada em substituição; *E. hyemale*, por ser uma espécie amplamente distribuída e comercializada no Brasil, também empregada em substituição à *E. arvense*, e; *E. bogotense*, por ser muito empregada com finalidades medicinais em alguns países da América do Sul, principalmente na Argentina.

Inicialmente foi realizada a caracterização físico-química e química da droga vegetal de *E. giganteum*. A determinação destes parâmetros é considerada relevante e essencial na avaliação de qualidade de plantas medicinais (WHO, 1998), sendo fundamentais para a elaboração de um produto derivado de qualidade.

*E. giganteum* apresentou perda por dessecação de  $11,85 \pm 0,11\%$ , próximo ao valor de  $10,91 \pm 1,60\%$  já relatado para a espécie (MORAES, 2011) e de  $12,5\%$  relatado para *E. arvense* (SANDHU *et al.*, 2010b). Os valores de perda por dessecação, se relacionados ao teor de água na amostra, bem como a avaliação das isotermas de sorção de umidade demonstram a higroscopia da droga vegetal (mesmo em condições ambientais usuais:  $26,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $68,5\%$  de umidade relativa) e a dificuldade em obter uma matéria-prima com umidade abaixo de  $10\%$ , estabelecido na monografia de *E. arvense* (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011). Os ensaios realizados demonstram que, após o processo de secagem de *E. giganteum*, o qual se mostrou relativamente de fácil e rápida execução para a planta rasurada, cuidados devem ser tomados durante o armazenamento da droga vegetal a fim de evitar sua reidratação, face ao fato de que a umidade dos materiais vegetais exerce grande influência sobre suas características físicas e estabilidade química e

microbiológica, e assim conseqüentemente, sobre sua qualidade (AL-MUHTASEB *et al.*, 2002; NOURHÈNE *et al.*, 2008).

Os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido encontrados para *E. giganteum* ( $20,18 \pm 0,22\%$ , e  $14,95 \pm 0,36\%$ , respectivamente, a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4h) foram semelhantes àqueles já relatados para *E. arvense* (SANDHU *et al.*, 2010b), destacando-se para esta última o teor de 22% de cinzas totais e 11% de cinzas insolúveis em ácido. Os valores relatados para *E. giganteum* por Moraes (2011) não puderam ser considerados, já que um valor de cinzas insolúveis superior ao de cinzas totais foi obtido, evidenciando erro metodológico ou troca nos resultados. Teores de cinzas totais e insolúveis de 22,45 e 17,35%, também foram relatados para *E. giganteum*, enquanto para *E. bogotense* foram de 24,93 e 20,03%, respectivamente (OVALLES *et al.*, 1996). A Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011) estabelece um teor de 12 a 27% de cinzas totais e de 3 a 15% de cinzas insolúveis em ácido para a droga vegetal de *E. arvense*. Teores dentro destas faixas também podem ser observados para as outras espécies do gênero. Estes dados demonstram o elevado teor de minerais e sílica presente no gênero, sendo uma característica relevante no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, já que outras matérias-primas vegetais farmacopêicas apresentam um teor máximo de cinzas totais entre 10 e 12% (Farmacopéia Brasileira, 2010; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011). Os elevados teores de cinzas totais apresentados por extratos aquosos de *E. giganteum* determinadas neste trabalho, também demonstram a relevância da avaliação dos minerais no controle de qualidade de derivados obtidos a partir desta espécie. A presença de altos teores de minerais, principalmente potássio, corroboram com o uso popular da espécie como diurética, uma vez que este mineral apresenta reconhecida atividade diurética (YOUNG *et al.*, 1976).

Com relação ao teor de extrativos em água e etanol, *E. giganteum* apresentou, respectivamente, um teor de  $11,52 \pm 0,18$  e  $6,81 \pm 0,08\%$ . Estes valores estão próximos do teor de extrativo em água e etanol de 15,45 e 4,32%, respectivamente, relatados para *E. arvense* (SANDHU *et al.*, 2010b), e de acordo com os rendimentos de extração, empregando ultrassom por 30 min., das partes aéreas de duas amostras de *E. ramosissimum*, 3,9 e 4,69% empregando água como líquido extrator, e 1,32 e 2,36% para etanol a 96% (ADSERSEN, ADSERSEN,

1997). Ao passo que, baixos rendimentos de extrativos solúveis em éter para *E. arvense*, e em acetona para *E. ramosissimum*, foram relatados nestes trabalhos. Moraes (2011), empregando soxhlet, relata teores de extrativos de  $16,79 \pm 1,84\%$  em água e de  $12,60 \pm 0,49\%$  em etanol, sendo observados rendimentos maiores quando se emprega soluções hidroalcoólicas como líquido extrator, com destaque para o etanol a 70%. Estes dados demonstram um maior rendimento bruto de extrativos de *Equisetum* spp. empregando água como líquido extrator quando comparado ao etanol e outros solventes mais apolares, indicando uma possível correlação com o elevado teor de minerais observados no extrato aquoso e não no extrato etanólico.

O teor de flavonóides totais encontrados em *E. giganteum* ( $0,420 \pm 0,014$  g%) mostrou-se de acordo com o preconizado para a espécie *E. arvense* (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011), onde um mínimo de 0,3% é estabelecido. Apesar das diferenças na metodologia utilizada, os teores de flavonóides e fenólicos totais aqui apresentados, mostraram-se próximos daqueles relatados por Moraes (2011) para *E. giganteum*.

O método cromatográfico empregado na análise por CCD, o mesmo empregado para *E. arvense* (WAGNER, BLADT, 1996; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011), mostrou-se adequado para avaliação dos compostos fenólicos de *E. giganteum*. Posteriormente, por meio de análise por CLAE-UV pode-se perceber que os principais constituintes do extrato aquoso de *E. giganteum* observados no cromatograma, apresentam espectro de UV característico de derivados de flavonóis, especialmente de canferol, e derivados do ácido cinâmico.

Os dados de caracterização físico-química e química de *E. giganteum* obtidos, contribuem para a avaliação e estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal, como também para o desenvolvimento tecnológico de derivados.

Após avaliações preliminares de constituição química de *E. giganteum*, onde foram verificadas semelhanças com outras espécies do gênero, realizou-se a caracterização qualitativa dos metabólitos secundários, os quais se mostram

relevantes para o estabelecimento de critérios químicos que permitam diferenciá-la das outras espécies do gênero.

Alcalóides já foram relatados no gênero *Equisetum* e são esperados apenas como traços em muitas espécies, entre elas *E. arvense* (MANSKE, MARION, 1942 *apud* HUNT, McKILLOP, 1964; WICHTL, 1994; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; GURBUZ *et al.*, 2009). Neste trabalho, ao avaliar a presença de alcalóides por CCD em algumas amostras de *Equisetum*, não foi possível visualizar mancha característica de nicotina na fração de alcalóides totais de nenhuma das amostras analisadas (*E. giganteum*, *E. arvense*, *E. hyemale* e *E. bogotense*), apesar do grande número de trabalhos indicando a presença de nicotina no gênero. Nas frações de alcalóides totais destas amostras, foi possível verificar apenas a presença de mancha com reação positiva para o reagente de Dragendorff, com Rf semelhante à tiamina (vitamina B1, C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>OS), com pequena diferença quantitativa entre as amostras. Como esta vitamina já havia sido relatada previamente para *E. ramosissimum* (MEYER, 1989), e parece estar presentes em todas as amostras avaliadas neste trabalho, pode-se esperar que esteja distribuída em todo o gênero.

A possível presença de tiamina ou outra vitamina nitrogenada do complexo B, por exibirem reação positiva frente ao reagente de Dragendorff, como visto em amostras de *Equisetum* spp., demonstra seu potencial em gerar resultados falso-positivos para alcalóides. Desta maneira, preconiza-se que a prospecção de alcalóides em amostras de *Equisetum* spp. deva ser realizada empregando métodos mais específicos, como por exemplo CCD, CLAE ou CG, para confirmar com segurança a presença ou ausência de alcalóides nas amostras. Assim, os resultados de prospecção fitoquímica clássicos devem ser vistos com cautela, como aqueles apresentados por Sandhu e col. (2010b). Nesse trabalho, o autor, trabalhando com as partes aéreas estéreis de *E. arvense*, relata resultados positivos para alcalóides nos extratos aquoso e etanólico, e resultados negativos nos extratos clorofórmico e éter de petróleo. Assim, há a possibilidade de que seja a tiamina o constituinte presente nestes extratos, indicando um resultado falso-positivo para alcaloides. Esta substância é facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol e insolúvel em solventes mais apolares, como éter etílico e benzeno (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Desta maneira, pode-se esperar que compostos com reação



positiva para alcalóides, como vitaminas do complexo B, estejam presentes em extratos mais polares obtidos a partir de amostras de *Equisetum*.

Assim, (i) a ausência do alcalóide nicotina nas amostras analisadas, (ii) as baixas concentrações de alcalóides esperadas no gênero, com exceção da palustrina em *E. palustre* (KARRER, EUGSTER, 1948; WAGNER, BLADT, 1996, p. 226), (iii) a baixa toxicidade apresentada em ensaios *in vitro* e *in vivo* por diferentes amostras (GONZÁLEZ *et al.*, 1993; TÉLLEZ *et al.*, 2007; BARACHO *et al.*, 2009; TAGO *et al.*, 2010; BUSSMANN *et al.*, 2011), (iv) a ausência de relatos de toxicidade envolvendo o uso de espécies do gênero (LEMUS *et al.*, 1996; REVILLA *et al.*, 2002), e (v) a tradicionalidade de uso em toda América Latina, demonstram uma possível segurança de uso para o gênero *Equisetum* spp. e seus derivados, entre elas *E. giganteum*.

Neste trabalho, alguns métodos por CCD foram avaliados, a fim de se obter perfil adequado de compostos fenólicos em *E. giganteum*. O sistema selecionado foi então empregado na análise comparativa do perfil cromatográfico de compostos fenólicos entre diferentes amostras de *E. giganteum* e outras espécies do gênero.

O método selecionado foi aquele descrito por Wagner e Bladt (1996, p. 226-227) empregando metanol como líquido extrator, placas de gel de sílica GF<sub>254</sub> como fase estacionária, ácido fórmico:ácido acético glacial:água:acetato de etila (11:11:26:100, v/v) como fase móvel, reagente Natural como revelador e observação sob luz UV, a 365 nm. O perfil cromatográfico obtido mostrou-se adequado e viável para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, principalmente por sua simplicidade e confiabilidade.

Esta análise permitiu verificar a presença de manchas fluorescentes azuis-esverdeadas, amarelas e alaranjadas, características de compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos, nas amostras de todas as espécies avaliadas. O baixo R<sub>f</sub> das manchas observadas no cromatograma de *E. giganteum*, *E. hyemale* e *E. bogotense* podem indicar a presença de compostos altamente glicosilados, e são de extrema relevância na diferenciação de *E. arvense*, a qual apresentou no seu cromatograma grande parte das manchas com R<sub>f</sub> superior a 0,5. Das substâncias de referência empregadas, a isoquercitrina se mostrou adequada como marcador para

*E. arvense*, tendo sido já relatada para esta espécie (VEIT *et al.*, 1995b). Enquanto para as outras espécies aqui avaliadas, manchas características de isoquercitrina, rutina e ácido clorogênico não foram observadas, mas se mostram adequadas para o cálculo de Rf relativos dos outros compostos observados.

Na seqüência, a análise por CLAE-DAD foi empregada na análise de um maior número de amostras de *Equisetum*. Esta técnica se destaca, quando comparado à análise por CCD, pois é capaz de fornecer informações mais precisas sobre os compostos, apresentando maior sensibilidade e resolução, além do espectro de ultravioleta (UV) de cada pico.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD de amostras de *Equisetum*, entre elas *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. hyemale* e *E. bogotense*, revelaram perfis semelhantes entre as amostras de uma mesma espécie, e algumas diferenças, tanto qualitativas quanto quantitativas, nos compostos fenólicos presentes nas diferentes espécies. A avaliação dos perfis cromatográficos revela, em todas as espécies, principalmente, a presença de alguns constituintes com espectro de UV e tempos de retenção característicos de ácidos fenólicos e flavonóis heterosídicos. Dentre as amostras avaliadas, *E. arvense* apresentou um perfil cromatográfico mais complexo, seguido de *E. giganteum*. As diferentes amostras de *E. giganteum*, procedentes da Argentina e do Brasil, apresentaram perfis cromatográficos muito semelhante entre si, indicando uma possível constância nos metabólitos secundários. *E. bogotense* e *E. hyemale* apresentaram em seus perfis cromatográficos muitos compostos que também parecem estar presentes em *E. giganteum*. Considerando a falta de um marcador químico definido para a espécie, a avaliação do perfil cromatográfico se mostra mais adequada para a caracterização da matéria-prima vegetal, podendo ser muito útil na padronização de derivados. Comparando os perfis cromatográficos de diferentes amostras comerciais e matérias-primas, pôde-se perceber que possivelmente algumas amostras rasuradas comercializadas como *E. arvense* e *Equisetum* sp. no Brasil, e como “Cola de Caballo” na Espanha, na verdade, se tratam de *E. giganteum*.

A comparação detalhada dos perfis obtidos por CLAE, entre as diferentes espécies de *Equisetum*, mostrou-se de difícil realização e muito suscetível a erros, principalmente devido à semelhança nos espectros de UV entre diferentes

compostos, à possível co-eluição de alguns deles e às pequenas, mas relevantes, variações nos tempos de retenção entre análises. Outro ponto que dificulta a análise é a falta de padrões comerciais disponíveis para aqueles compostos já relatados para o gênero (VEIT *et al.*, 1995b). Desta maneira, para uma melhor diferenciação fitoquímica através do perfil cromatográfico, seria adequada a avaliação de um maior número de amostras, a fim de avaliar variações intra-específicas, e o emprego de métodos cromatográficos mais avançados e eficientes como, por exemplo, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), e detector de massas acoplado ao detector de arranjo de diodos, fornecendo assim maior reprodutibilidade entre análises e maior número de informação sobre cada sinal/composto (tempo de retenção, área do pico, espectro de UV e dados de massas), tornando assim, a diferenciação mais fidedigna. Estes dados, ao serem submetidos à análise estatística multivariada dos componentes principais (CHENG *et al.*, 2010, TOH *et al.*, 2010), podem subsidiar de maneira objetiva e estatística a diferenciação das espécies analisadas, facilitando a escolha de um marcador químico para cada uma delas. Mas, para a aplicação desta ferramenta estatística, é imprescindível partir de um extrato que garanta um perfil cromatográfico representativo dos compostos presentes na matéria-prima vegetal e que possa ser obtido de maneira reprodutível, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, sendo necessária então a otimização do processo extrativo.

Para a droga vegetal de *E. giganteum*, esta otimização foi realizada após avaliação de diferentes métodos e líquidos extratores, sendo ao final as amostras analisadas por CLAE-DAD. Os processos extrativos testados foram estabelecidos após avaliações preliminares, sendo selecionados métodos de fácil execução e o emprego de solventes usuais. Os resultados demonstraram que maior reprodutibilidade, com melhores perfis cromatográficos quali e quantitativos para os compostos fenólicos presentes na amostra (principalmente para derivados de ácidos fenólicos e flavonóides), foram obtidos através do emprego de sonicação e etanol 50% (v/v). O emprego de soluções hidroalcoólicas e sonicação demonstrou ser um processo adequado na preparação de amostras a serem submetidas à avaliação comparativa de perfis cromatográficos, tanto que seu uso já foi relatado em trabalhos aplicando análise estatística multivariada de dados cromatográficos na identificação de espécies vegetais (CHENG *et al.*, 2010; TOH *et al.*, 2010).

Todos os perfis cromatográficos por CLAE obtidos de diferentes amostras de *E. giganteum*, independente das soluções extrativas empregadas, demonstraram a presença de compostos com espectro de UV característico de derivados heterosídicos de flavonóis (MARKHAM, MABRY, 1975), alguns deles possivelmente com a mesma aglicona. Diferentes flavonóides heterosídicos, derivados de algumas poucas agliconas, já foram relatados para outras espécies de *Equisetum* (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b). Como a análise de heterosídeos se mostra de difícil realização, principalmente quando consideramos a complexidade do extrato, a freqüente co-eluição de compostos e a falta de padrões comerciais, a hidrólise destes heterosídeos com a análise das agliconas resultantes se torna uma alternativa interessante, sendo estas últimas mais fáceis de serem identificadas e quantificadas (HERTOG *et al.*, 1992).

Geralmente a hidrólise de flavonóides heterosídicos requer altas concentrações (1 a 2 M) de ácidos minerais sob condições de refluxo (HERTOG *et al.*, 1992). Entretanto, as condições de hidrólise devem ser otimizadas para que a aglicona possa ser completamente liberada, sem promover sua degradação. As condições ótimas de hidrólise variam para diferentes matérias-primas vegetais, o que pode ser esperado, considerando as variações de matrizes e na composição e substituição dos flavonóides (HUBER *et al.*, 2007).

A otimização do processo de hidrólise dos flavonóides heterosídicos de *E. giganteum* pelos métodos clássicos, envolveria a mudança de uma variável independente (concentração de ácido, tempo, temperatura, etc.), enquanto todas as outras ficariam fixadas em um nível, o que se tornaria trabalhoso e demorado. Para contornar esta dificuldade o processo de hidrólise foi estatisticamente otimizado, empregado Desenho Experimental Fatorial e Análise de Superfície de Resposta (MYERS *et al.*, 2009). Para análise quantitativa individual das agliconas resultantes do processo de hidrólise, metodologia analítica empregando CLAE-UV foi desenvolvida, e posteriormente validada segundo a ICH (2005).

Através deste processo, condições ótimas de hidrólise foram estabelecidas para a droga vegetal de *E. giganteum* e as agliconas obtidas puderam ser avaliadas quantitativamente. As únicas agliconas identificadas e quantificadas após a hidrólise do material foram quercetina e canferol, esta última em maior concentração. Esta

metodologia foi avaliada comparativamente com o método de hidrólise e de doseamento de flavonóides totais descrita na monografia de *E. arvense* (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011), a qual emprega hidrólise ácida e quantificação das agliconas por espectrofotometria, na forma de quelatos de alumínio. Para isto, e também para verificar a aplicabilidade do método, amostras de quatro espécies de *Equisetum* foram avaliadas: *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. hyemale* e *E. bogotense*.

Os resultados comparativos demonstraram que o processo de hidrólise otimizado para *E. giganteum*, associado ao processo de extração desenvolvido, é capaz de fornecer maiores teores de flavonóides totais (determinados espectrofotometricamente) e de quercetina e canferol (determinadas por CLAE-UV), quando comparado ao método de hidrólise/extração descrito na monografia de *E. arvense*. Estes dados indicam que o emprego do método farmacopêico fornece teores sub-estimados de flavonóides totais (determinação espectrofotométrica) para as quatro espécies analisadas, incluindo a própria *E. arvense*, o que pôde ser confirmado pelo doseamento cromatográfico das agliconas. Estes dados revelam a influência do método e condições de hidrólise no doseamento de flavonóides totais e agliconas para as quatro espécies analisadas, bem como a necessidade de se aprimorar o processo de hidrólise e extração para *E. arvense* apresentado pela Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011), já que o método ali descrito não é capaz de hidrolisar completamente todos os flavonóides heterosídicos presentes.

Entre as espécies analisadas, *E. arvense* foi a que apresentou maior teor de flavonóides totais e de agliconas, sendo a única que apresentou maior teor de quercetina do que de canferol. Estes dados, associados àqueles apresentados por Veit e col. (1995b), indicam que os derivados heterosídicos da quercetina são esperados como os principais flavonóides em *E. arvense*. Graefe e Veit (1999) também encontraram num extrato aquoso padronizado de *E. arvense*, além de ésteres do ácido caféico, derivados heterosídicos da quercetina como principais flavonóides. Já para *E. giganteum*, *E. hyemale* e *E. bogotense* pôde-se observar um teor superior de canferol em relação ao de quercetina. Estes valores foram semelhantes entre *E. giganteum* e *E. hyemale*, enquanto *E. bogotense* apresentou maior teor de canferol e menor de quercetina em relação à estas duas espécies.

O método por CLAE-UV desenvolvido e validado mostrou-se adequado para a avaliação do perfil de agliconas e sua quantificação nas amostras avaliadas. A perspectiva inicial de diferenciar quimicamente estas quatro espécies através do seu perfil de agliconas não alcançou êxito, já que apenas *E. arvense* apresentou um perfil de agliconas diferenciado, qualitativo e quantitativo. Entretanto, o estabelecimento de quercetina e canferol como marcadores para análises quantitativas da droga vegetal de *E. giganteum* pôde ser realizado com sucesso. Um dado relevante observado neste trabalho é que estas duas agliconas não foram encontradas na amostra de *E. giganteum* na forma livre. Este dado está de acordo com o informado por Veit e col. (1995b) para algumas espécies de *Equisetum*, indicando que agliconas de flavonóides só podem ser detectadas em amostras muito antigas, imprópriamente secas, armazenadas em ambientes úmidos ou constituírem artefatos formados durante o processo de secagem ou extração.

Apesar do emprego de CCD e CLAE-DAD na análise dos compostos fenólicos de *E. giganteum*, e de avaliação das agliconas por CLAE-UV, poucas informações sobre a química dos compostos fenólicos presentes nesta espécie estão disponíveis, havendo apenas a indicação da presença de ácidos fenólicos e de derivados heterosídicos do canferol e da quercetina.

Tentativas infrutíferas de isolamento dos derivados heterosídicos de flavonóides foram realizadas empregando-se cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa em sílica gel (dados não apresentado neste trabalho). Durante o processo, houve dificuldade de se obter compostos puros, baixo rendimento na purificação e degradação de muitos heterosídeos. Desta maneira, uma alternativa para a caracterização dos compostos fenólicos presentes *E. giganteum* foi a realização de análise por CLAE-DAD seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM), uma técnica muito útil na elucidação estrutural de compostos fenólicos, que permite a análise em extratos brutos sem purificação prévia dos compostos e amplamente aplicada na caracterização de flavonóides heterosídicos (FERRERES *et al.*, 2004; VALLEJO *et al.*, 2004).

Com o auxílio da CLAE-EM foi possível caracterizar, pela primeira vez, a estrutura de alguns dos principais compostos fenólicos presentes no extrato

hidroetanólico de *E. giganteum*. Os principais flavonóides encontrados e caracterizados foram derivados heterosídicos do canferol, com destaque para os 3-O- e 3,7-O-heterosídeos. Estes dados estão de acordo, com aqueles previamente relatados no doseamento das agliconas, obtidas após hidrólise ácida de *E. giganteum*, onde canferol foi identificado como componente majoritário.

Após revisão bibliográfica, podemos observar que os flavonóides heterosídicos derivados do canferol aqui encontrados já foram relatados para algumas espécies de *Equisetum*, inclusive como componentes minoritários de *E. arvense* (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b; WIEDENFELD *et al.*, 2000; PARK, TOMOHIKO, 2011), enquanto que outros compostos fenólicos mais raros não haviam sido relatados no gênero, uma estilpirona heterosídica e um éster de ácido fenólico. Apesar das fortes evidências estruturais obtidas pelos perfis de fragmentação, a confirmação estrutural destes compostos só será garantida após seu isolamento e análise empregando técnicas espectroscópicas complementares como, por exemplo, RMN uni e bidimensional.

Ao realizar uma comparação dos flavonóides heterosídicos caracterizados em *E. giganteum* com aqueles já descritos para outras espécies de *Equisetum* (SALEH, ABDALLA, 1980; VEIT *et al.*, 1995a, 1995b; WIEDENFELD *et al.*, 2000; PARK, TOMOHIKO, 2011), pôde-se verificar a presença do canferol-3-O-soforosídeo nas três espécies previamente avaliadas *E. arvense*, *E. hyemale* e *E. bogotense*. O canferol-3-O-soforosídeo-7-O-glicosídeo pôde ser encontrado em *E. hyemale* e *E. bogotense*, mas não em *E. arvense*. O canferol-3-O-glicosídeo, o canferol-3,7-di-O-glicosídeo e a quercetina-3,7-di-O-glicosídeo foram encontrados em *E. arvense*, mas não em *E. hyemale* e *E. bogotense*. Entre estes derivados do canferol, o canferol-3-O-soforosídeo foi relatado para praticamente todas as espécies já avaliadas nas referências consultadas, demonstrando um potencial como marcador para o gênero. Estes derivados flavonoídicos também podem ser empregados como marcadores quimiotaxonômicos (WIEDENFELD *et al.*, 2000).

Os ácidos fenólicos caracterizados na amostra de *E. giganteum* não haviam sido relatados para nenhuma espécie de *Equisetum*, enquanto apenas uma das estilpironas encontradas, a equisetumpirona, havia sido relatada para *E. arvense* e ramos férteis de *E. bogotense* (VEIT *et al.*, 1995b). Este autor ainda relata que

glicosídeos de estilpironas, como a equisetumpirona, são típicos de ramos férteis de espécies do gênero *Equisetum*. Porém, em nosso trabalho, esta substância foi detectada na amostra de *E. giganteum* submetida a análise por CLAE-EM (amostra nº 20, Capítulo 3), coletada no mês de maio, quando não apresenta estróbilos nas extremidades de ramos vegetativos.

Estes dados demonstram a dificuldade de diferenciação das espécies apenas considerando um ou outro composto específico, que pode variar por influência de fatores edafoclimáticos, do estágio de desenvolvimento do vegetal, do processamento das amostras e a possível presença de híbridos entre as espécies. Outro fator relevante é a possível presença de quimiotipos, como acontece com *E. arvense*. Desta maneira, e principalmente para evitar a influência de fatores intra-específicos, a caracterização de uma amostra deve ser realizada pela avaliação do conjunto de compostos presentes no perfil cromatográfico, tanto pela presença, quanto pela ausência de compostos (VEIT *et al.*, 1995a, 1995b).

Estes dados demonstram o potencial de derivados heterosídicos do canferol como marcadores qualitativos e quantitativos para *E. giganteum*, mas considerando que não há padrões comerciais disponíveis para os compostos que aparecem em maior concentração no extrato hidroetanólico de *E. giganteum*, e que seu isolamento é laborioso, o doseamento por CLAE das agliconas dos flavonóides obtido após processo de hidrólise da matéria-prima vegetal, ainda se mostra interessante do ponto de vista quantitativo e de especificidade.

Após a caracterização e a avaliação de parâmetros de controle de qualidade para a matéria-prima vegetal, a produção de um extrato a partir de *E. giganteum* se mostra promissora pela importância da espécie para o mercado farmacêutico, ainda mais se considerarmos (i) o amplo emprego medicinal de *E. giganteum* na América Latina, (ii) que extratos desta planta fazem parte de numerosas preparações e medicamentos fitoterápicos na Argentina (AQUILA *et al.*, 2006; STOLIAR, 2009) e (iii) do possível uso de *E. giganteum* em produtos alimentícios e preparações farmacêuticas no Brasil.

Os extratos aquosos de plantas geralmente exibem baixa estabilidade, com destaque para os compostos fenólicos, que são extremamente suscetíveis à oxidação e a degradação térmica (BUCHNER *et al.*, 2006). Assim, a transformação



de soluções extrativas em produtos secos apresenta inúmeras vantagens, tais como maior concentração de constituintes químicos, estabilidade, facilidade de manuseio e armazenamento (LIST e SCHMIDT, 1989; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

Entre as técnicas empregadas em larga escala na produção de extratos secos de origem vegetal, principalmente para a produção de fitomedicamentos, está a secagem por *spray drying*, um processo versátil que apresenta baixos riscos de degradação dos constituintes químicos durante a operação (LIST e SCHMIDT, 1989; BROADHEAD *et al.*, 1992; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Desta maneira, mostra-se como uma técnica adequada para a secagem de extratos vegetais contendo heterosídeos, compostos com relativa instabilidade e suscetíveis à hidrólise.

Para a elaboração da solução extrativa de *E. giganteum* empregou-se o método de decocção. A escolha deste processo foi baseada no amplo uso tradicional de decoctos desta espécie, no bom rendimento de metabólitos secundários obtidos durante avaliação preliminar de diversos processos extrativos empregando-se este solvente e no alto teor de extrativos obtidos na extração com água quente. A solução extrativa aquosa obtida, apesar de apresentar baixo rendimento de resíduo seco ( $1,54 \pm 0,00\%$ , m/v), foi submetida à secagem empregando-se equipamento semi-industrial de secagem por *spray drying*. A literatura recomenda que a solução a ser nebulizada deva possuir um teor de sólidos entre 15-40% (LIST, SCHMIDT, 1989), tanto por razões econômicas quanto pela maior recuperação do produto seco. Além disto, a maioria das soluções extrativas só apresentam viabilidade de secagem por este método, quando adjuvantes de secagem são empregados com vistas a reduzir a aderência do produto seco às paredes da câmara de secagem. Entretanto, no caso da solução extrativa de *E. giganteum*, obteve-se sucesso na secagem, apesar do baixo teor de resíduo seco e ausência de adjuvante de secagem, resultando em rendimento de 85,6% (m/m), próximo aos resultados obtidos por Soares (2002), empregando solução extrativa mais concentrada de *Maytenus ilicifolia* com adjuvante de secagem, no mesmo equipamento.

O extrato seco obtido apresentou uma alta umidade residual (perda por dessecação de  $11,4 \pm 0,25\%$ ), o que contribui para suas características tecnológicas

deficientes, como baixa fluidez, indicada pelo índice de Carr e fator de Hausner encontrados. Apesar disto, uma baixa atividade de água foi observada, contribuindo para a estabilidade química e microbiológica do produto. Os elevados teores de açúcares redutores e minerais presentes no extrato seco podem ser responsáveis pela dificuldade em se obter um extrato com baixa umidade residual. A baixa fluidez e tendência de aglomeração do extrato obtido também podem ser explicadas pelo pequeno tamanho, morfologia esferoidal e superfície rugosa das partículas. Comparativamente ao método de secagem por liofilização, a secagem por *spray drying* apresentou melhor eficiência, considerando a umidade residual e a atividade de água. O perfil dos metabólitos secundários presentes nos produtos oriundos de ambos processos foi semelhante, quando avaliados por CLAE-DAD.

Os parâmetros tecnológicos apresentados pelo extrato seco por *spray drying* apontam para um produto com característica de empacotamento pouco estáveis e fluxo deficitário, indicando a necessidade do uso de excipientes para a elaboração de um produto derivado. Produtos com melhores características também podem ser obtidos pela adição de adjuvantes de secagem na solução extrativa submetida ao processo de secagem por *spray drying*, podendo assim obter-se um extrato seco com menor umidade residual e melhores características tecnológicas.

Quimicamente, o extrato aquoso seco obtido de *E. giganteum* destacou-se por apresentar um elevado teor de minerais (principalmente potássio) e açúcares, o que corrobora o uso tradicional de preparações aquosas da planta como diurética, remineralizante (OVALLES *et al.* 1996) e antidiarréica (GORZALCZANY *et al.* 1999).

Em suma, a obtenção deste extrato seco sem o emprego de adjuvantes de secagem, é fenômeno raro do ponto de vista tecnológico e revela sua importância na potencial utilização em estudos de atividades biológicas (*in vitro* e *in vivo*) e clínicas, sem que haja a interferência de adjuvantes. Este extrato poderá constituir-se em referência para outros extratos a serem desenvolvidos com adição de adjuvantes ou inseridos em formas de liberação, visando o posterior desenvolvimento de um produto fitoterápico seguro e eficaz.



**CONCLUSÕES GERAIS**

---



Os dados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a revisão bibliográfica indicou que as partes aéreas de *Equisetum giganteum* são amplamente comercializadas e empregadas com finalidades medicinais em toda América Latina, apesar dos poucos estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos, demonstrando falta de comprovação de segurança e eficácia para a espécie;
- a matéria-prima vegetal apresenta característica higroscópica com presença de histerese na curva de sorção de umidade, indicando a necessidade de uso de embalagens especiais durante seu armazenamento;
- a caracterização físico-química e química das partes aéreas de *E. giganteum* contribui para o estabelecimento de parâmetros e desenvolvimento de métodos para o controle de qualidade e padronização da matéria-prima vegetal;
- o elevado teor de cinzas totais apresentado pela matéria-prima e extratos aquosos de *E. giganteum* indicam que esta planta é uma importante fonte de minerais, corroborando seu uso como remineralizante;
- alcalóides não foram detectados nas amostras avaliadas de *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. bogotense* e *E. hyemale*. Entretanto, compostos com características cromatográficas semelhantes à tiamina foram encontrados em todas as amostras, induzindo à resultado falso-positivo para alcalóides;
- o perfil cromatográfico obtido por CCD e CLAE-DAD de diferentes amostras de *Equisetum* spp. mostrou-se apropriado para a avaliação qualitativa dos compostos fenólicos presentes, constituindo-se em parâmetros de extrema relevância na diferenciação química entre as espécies *E. giganteum*, *E. arvense*, *E. bogotense* e *E. hyemale*;
- a isoquercitrina demonstrou potencial para ser empregada como marcador de *E. arvense*, subsidiando critérios químicos que permitem diferenciá-la das outras espécies analisadas, enquanto o canferol-3-O-soforosídeo-7-O-glicosídeo parece estar presente somente em *E. giganteum*, *E. hyemale* e *E. bogotense*, mas não em *E. arvense*;

- os perfis cromatográficos obtidos por CLAE demonstram que possivelmente algumas amostras rasuradas, comercializadas como *E. arvense* e *Equisetum* sp. no Brasil, e como “Cola de Caballo” na Espanha, sejam amostras de *E. giganteum*;
- o método de hidrólise dos flavonóides heterosídicos presentes nas partes aéreas de *E. giganteum* foi estatisticamente otimizado, mostrando-se mais adequado que aquele estabelecido na monografia de *E. arvense* pela Farmacopéia Britânica 2011, apresentando também, potencial de utilização para as outras espécies do gênero;
- o método de hidrólise/extração descrito na monografia de *E. arvense* pela Farmacopéia Britânica 2011 fornece teores sub-estimados de flavonóides totais, indicando a necessidade do seu aprimoramento;
- o método analítico por CLAE-UV desenvolvido para a análise quantitativa das agliconas quercetina e canferol, obtidas após hidrólise e extração de *E. giganteum*, foi validado segundo preconiza a ICH, mostrando-se adequado para este tipo de análise;
- as agliconas quercetina e canferol podem ser empregadas como marcadores para análises qualitativas e quantitativas da droga vegetal de *E. giganteum*;
- derivados heterosídicos do canferol, ácidos fenólicos e estilipironas foram os principais metabólitos secundários presentes em *E. giganteum*, sendo caracterizados através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta/visível e espectrometria de massas seqüencial;
- os compostos caracterizados, principalmente os flavonóides, são de grande valia na caracterização de *E. giganteum* e podem ser empregados como marcados quimiotaxonômicos;
- apesar do elevado teor de sílica e minerais em *E. giganteum*, o processo de extração por decocção mostrou-se mais seletivo para os minerais, sendo capaz de extrair apenas uma pequena quantidade de sílica presente;
- a obtenção de produto seco por *spray drying* em torre de secagem semi-industrial, diretamente a partir de solução extrativa aquosa de *E. giganteum* e sem o emprego de adjuvantes de secagem, mostrou-se viável e com excelente rendimento;

- o extrato seco obtido não apresentou características tecnológicas adequadas para a compressão direta ou produção de cápsulas, sendo recomendado o emprego de adjuvantes ou sua transformação em granulado, para a produção de formas farmacêuticas sólidas derivadas.

Em suma, o presente trabalho representa uma das primeiras contribuições sobre a espécie *E. giganteum*, contemplando apenas uma parte do processo de estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, derivados, produtos intermediários ou fitoterápicos. Os resultados apresentados são de grande relevância para a elaboração de uma monografia oficial de *E. giganteum*, bem como para o desenvolvimento de extrato seco padronizado. A ausência de adjuvantes de secagem, além de permitir sua utilização em testes farmacológicos e toxicológicos, representa um ponto de partida relevante para o desenvolvimento tecnológico de produtos derivados.





## REFERÊNCIAS

---



ABDEL-MALEK, S.; BASTIEN, J. W.; MAHLER, W. F.; JIA, Q.; REINECKE, M. G.; ROBINSON, W. E. JR.; SHU, Y.; ZALLES-ASIN, J. Drug leads from the Kallaway herbalists of Bolivia. 1. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 157-166, 1996.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J.; AKAHANE, H.; OGURA, T.; MARTINEZ-ALFARO, M. A.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in Plants 5.<sup>1</sup>) Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea Americana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1314-1317, 2005.

ADSERSEN, A.; ADSERSEN, H. Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects - an experimental and ethnobotanical evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 189-206, 1997.

AHMED, O. M.; MONEIM, A. A.; YAZID, I. A.; MAHMOUD, A. M. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia Croatica**, v. 39, n. 1, p. 15-35, 2010.

AL-MUHTASEB, A. H.; MCMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 80, n. 2, p. 118-128, 2002.

AL-QURA'N, S. Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 119-129, 2005.

ALONSO PAZ, E.; CERDEIRAS, M. P.; FERNANDEZ, J.; FERREIRA, F.; MOYNA, P.; SOUBES, M.; VÁZQUEZ, A.; VERO, S.; ZUNINO, L. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 67-70, 1995.

ALVIN-CARNEIRO, P. Envenenamento por *Equisetum* sp. (Cavalinha). **Ceres**, v. 8, p. 32-36, 1948.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 325-348, 2005.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H.; REVILLA, M. C.; SERGIO, I. A. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.129-133, 2000.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **Consulta de Produtos: Medicamentos**, 2012. Disponível em: <[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp)>. Acesso em: 21 jan. 2012.

AQUILA, S.; STOLIAR, C.; VENTRICE, G.; CONFORTI, P.; SPEGAZZINI, E.; VOLONTÉ, M. G.; DEBENEDETTI, S. Parámetro micrográficos y cromatográficos para una monografía de “cola de caballo” *Equisetum giganteum* (Equisetaceae). **Revista de Fitoterapia**, Valencia, v. 6, supl. 1, p. 123, 2006.

BARACHO, N. C. V.; VICENTE, B. B. V.; ARRUDA, G. D’A. S.; SANCHES, B. C. F.; BRITO, J. Study of acute hepatotoxicity of *Equisetum arvense* L. in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 449-453, 2009.

BARBOSA, A. P.; PARENTE, J. P.; PEREIRA DA SILVA, B. Estudos Químicos sobre Plantas Utilizadas na Medicina Tradicional com Potencial Atividade Diurética. In: JORNADA GIULIO MASSARANI DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ARTÍSTICA E CULTURAL DA UFRJ, 27., 2005, Rio de Janeiro. **Resumos ...** Rio de Janeiro: UFRJ, 1997. Área da Saúde, p. 6-7.

BEADLE, B. W.; GREENWOOD, D. A.; KRAYBILL, H. R. Stability of thiamine to heat. I. Effect of pH and buffer salts in aqueous solutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 149, n. 2, p. 339-347, 1943.

BEBBINGTON, A.; WRIGHT, B. Toxicity of *Equisetum* to Horses. **Agdex**, 460/666, 2007. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Factsheet. Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/07-037.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2011.

BLUMENTHAL, M. (Ed.); GOLDENBERG, A.; BRINCKMANN, J.; FOSTER, S.; TYLER, V. E. **Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs**. Newton, Mass : Integrative Medicine Communications, 2000. p. 208-2011.

BLUNDEN, G.; PATEL, A.; ROMERO, M. A.; GUIRY, M. D. Betaines in four additional phyla of green plants. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 1, p. 101-103, 2009.

BOURDOUX, P.; VANDERVORST, D.; HOOTELÉ, C. The isolation of indole-3-carboxaldehyde from *Equisetum telmateia*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 8, p. 1934-1935, 1971.

BOURDY, G.; CHAVEZ DE MICHEL, L. R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 189-208, 2004.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 379-381, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Série B – Textos básicos de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, fev. 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1)>. Acesso em: 23 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 abril 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Fitoterapia**: plantas de interesse ao SUS. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1)>. Acesso em: 12 ago. 2010b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Consulta Pública nº 73, de 16 de julho de 2010**. Proposta do Formulário Nacional Fitoterápico, 2010c. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6ce3cf80434ade79bfb3bfff30613c2e/C+N%C2%BA+73+COFAR+%282%29.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 nov. 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2011. Volume IV. Herbal Drugs. British Pharmacopoeia Commission Secretariat, London: The Stationary Office, 2011.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray-drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.

BRUNE, T.; THIV, M.; HAAS, K. *Equisetum* (Equisetaceae) species or hybrids? ISSR fingerprinting profiles help improve diagnoses based on morphology and anatomy. **Plant Systematics and Evolution**, v. 274, n. 1-2, p. 67-81, 2008.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 21, p. 3229-3235, 2006.

BUSSMANN, R. W.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; DUBOSE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MARTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 121-140, 2011.

BUSTAMANTE, P. M. A. C.; LEITE, M. A. S. Análise da cadeia farmacêutica no estado de Goiás. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEG, 4., 2006, Anápolis. **Anais ...** Anápolis: UEG, 2006. Área Ciências Sociais Aplicadas. p. 850-855. Disponível em: <[http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2006/arquivos/sociais/analise\\_cadeia.pdf](http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2006/arquivos/sociais/analise_cadeia.pdf)>. Acesso: 26 nov. 2010.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; ALVARADO, S. R.; TORRES, M. F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 223-237, 1987a.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; MARTINEZ, A. M. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 233-245, 1987b.

CANÍGUEVAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CANTORES, F.; SORGI, P.; ARCESE, A.; BIDOLI, A.; BRUNI, F.; CARNEVALE, C.; CALVIERI, S. Improvement of psoriatic onychodystrophy by a water-soluble nail lacquer. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 7, p. 832-834, 2009.

CARRIZO, E. V.; PALACIO, M. O.; ROIC, L. D. Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero (Argentina). **Dominguezia**, v. 18, n. 1, p. 26-35, 2002.

CASTILLO-JUÁREZ, I.; GONZÁLEZ, V.; JAIME-AGUILAR, H.; MARTÍNEZ, G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 402-405, 2009.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

ČETOJEVIĆ-SIMIN, D. D.; CANADANOVIĆ-BRUNET, J. M.; BOGDANOVIĆ, G. M.; DJILAS, S. M.; CETKOVIĆ, G. S.; TUMBAS, V. T.; STOJILJKOVIĆ, B. T. Antioxidative and Antiproliferative Activities of Different Horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 452-459, 2010.

CEUTERICK, M.; TORRY, B.; PIERONI, A. Cross-cultural adaptation in urban ethnobotany: The Colombian folk pharmacopoeia in London. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 342-359, 2008.

CEUTERICK, M.; VANDEBROEK, I.; PIERONI, A. Resilience of Andean urban ethnobotanies: A comparison of medicinal plant use among Bolivian and Peruvian migrants in the United Kingdom and in their countries of origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 27-54, 2011.

CHENG, X. M.; ZHAO, T.; YANG, T.; WANG, C. H.; BLIGH, S. W.; WANG, Z. T. HPLC Fingerprints Combined with Principal Component Analysis, Hierarchical Cluster Analysis and Linear Discriminant Analysis for the Classification and Differentiation of *Peganum* sp. indigenous to China. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 3, p. 279-289, 2010.



CORLETTI, F. Terapia dell'osteoporosi climaterica con estratto titolato di Equiseto piu calcio (Osteosil calcium). Studio in doppio cieco, randomizzato. **Minerva Ortopedica e Traumatologica**, v. 50, n. 5, p. 201-208, 1999.

COUTO, A. G. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. – Euphorbiaceae (quebra-pedra)**. 2000. 179p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p. 208-209

CURRIE, H. A.; PERRY, C. C. Chemical evidence for intrinsic 'Si' within *Equisetum* cell walls. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 2089-2095, 2009.

CZECZUGA, B. Carotenoids in Sixty-six Representatives of the Pteridophyta. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 13, n. 3, p. 221-230, 1985.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO<sub>2</sub>: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1054-1059, 2007.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, v. 63, n. 5, p. 417-440, 1992.

DE FEO, V. Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 243-256, 2003.

DE FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo\\_fitoterapicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2012.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

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**, v. 49, n. 3, p. 239-243, 2004.

DOS SANTOS, J. G. JR.; BLANCO, M. M.; DO MONTE, F. H.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V. M.; LEAL, L. K.; CUNHA, G. M. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 508-513, 2005.

DWIVEDI, B. K.; ARNOLD, R. G. Chemistry of thiamine degradation on food products and model systems. Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 54-60, 1973.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Plantas medicinais e aromáticas. Disponível em: <[http://www.cenargen.embrapa.br/\\_tt/tt04\\_07plantasm.html](http://www.cenargen.embrapa.br/_tt/tt04_07plantasm.html)>. Acesso: 05 jan. 2011.

ESTOMBA, D.; LADIO, A.; LOZADA, M. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 109-119, 2006.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5 ed. Strasbourg: European department for the Quality of Medicines, 2005.

FARIAS, M. R. Avaliação da Qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 12, p. 263-288.

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2010.

FARMACOPEIA ESPANHOLA. 2. ed., suplemento 2.1. [s.l.]: [s.n.], 2002. 1 CD-ROM

FERRERES, F.; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 312-321, 2004.

FORZZA, R. C. (Coord.); LEITMAN, P. M.; COSTA, A. F.; CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M. N.; MAMEDE, M. C.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T. B.; SOUZA, V. C. Introdução. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 18 março 2011.

FUENTES, O.; ARANCIBIA-AVILA, P.; ALARCÓN, J. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. **Fitoterapia**, v. 75, n. 6, p. 527-532, 2004.

GALLO, F. R.; MULTARI, G.; FEDERICI, E.; PALAZZINO, G.; GIAMBENEDETTI, M.; PETITTO, V.; POLI, F.; NICOLETTI, M. Chemical fingerprinting of *Equisetum arvense* L. using HPTLC densitometry and HPLC. **Natural Product Research**, v. 25, n. 13, p. 1261-1270, 2011.

GIERLINGER, N.; SAPEI, L.; PARIS, O. Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. **Planta**, v. 227, n. 5, p. 969-980, 2008.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

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.

GOLENIOWSKI, M. E.; BONGIOVANNI, G. A.; PALACIO, L.; NUÑEZ, C. O.; CANTERO, J. J. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 324-341, 2006.

GONZÁLEZ, A.; FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P.; PAZ, E. A. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 217-220, 1993.

GORZALCZANY, S.; ROJO, A.; RONDINA, R.; DEBENEDETTI, S.; ACEVEDO, C. Estudio de Toxicidad Aguda por Vía Oral de Plantas Medicinales Argentinas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 18, n. 3, p. 221-224, 1999.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5-6, p. 315-320, 1997.

GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 239-246, 1999.

GUILLON, J.-M. Phylogeny of Horsetails (*Equisetum*) based on the Chloroplast rps4 Gene and Adjacent Noncoding Sequences. **Systematic Botany**, v. 29, n. 2, p. 251-259, 2004.

GURBUZ, I.; YESILADA, E.; ITO, S. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 360-365, 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAMMOND, G. B.; FERNÁNDEZ, I. D.; VILLEGAS, L. F.; VAISBERG, A. J. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-30, 1998.

HARRISON, C.C. Evidence for intramineral macromolecules containing protein from plant silicas. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 1996.

HEGNAUER, R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2423-2427, 1988.

HERNÁNDEZ, M. P.; COLARES, M. N.; CIVITELLA, S. M. Plantas utilizadas en medicina popular en un sector del Partido de Berisso, Buenos Aires, Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, n. 5, p. 435-444, 2009.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, 1992.

HILGERT, N. I. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 11-34, 2001.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

HUNT, J. D.; McKILLOP, A. Pyridine and Piperidine Alkaloids. In: COFFEY, S. (Ed.). **Rodd's Chemistry of Carbon Compounds**. 2.ed. New York : Elsevier, 1964. vol. IV, parte G, capítulo 30, p. 115. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044453345650763X>>. Acesso em: 04 jan. 2012.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Stability testing of new drug substances and products**. Q1A(R2). Switzerland: ICH Steering Committee, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Q2(R1). Switzerland: ICH Steering Committee, 2005. 17p.

JORGE, L. I. F.; CHICOUREL, E. L.; GRACIOANO, R. A. S.; VICENTE, R. Caracterização morfo-histológica para a “cavalinha” (*Equisetum giganteum* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 20, n. 1, p. 51-57, 1999.

JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

JOUAD, H.; LACAILLE-DUBOIS, M. A.; LYOUSSI, B.; EDDOUKS, M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 159-163, 2001.

JUNG, U. J.; LEE, M.-K.; PARK, Y. B.; JEON, S.-M.; CHOI, M.-S. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 476-483, 2006.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P. S. M. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, n. 1, p. 97-103, 2006.

KARRER, P.; EUGSTER, C. H. Über ein Alkaloid aus Equisetum palustre. **Helvetica Chimica Acta**, v. 31, n. 4, p. 1062-1066, 1948.

KIM, H.; SONG, M.-J. Analysis and recordings of orally transmitted knowledge about medicinal plants in the southern mountainous region of Korea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 676-696, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

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, n. 2, p. 309-312, 2005.

LEAL, D. P.; ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. A hysteretic invertase from *Equisetum giganteum* L. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1009-1016, 1999.

LEMUS, I.; GARCÍA, R.; ERAZO, S.; PEÑA, R.; PARADA, M.; FUENZALIDA, M. Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in healthy volunteers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, n. 1, p. 55-58, 1996.

LI, P.; MATSUNAGA, K.; OHIZUMI, Y. Enhancement of the nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells by Chinese and Paraguayan medicinal plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 7, p. 752-755, 1999.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.

LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton: CRC, 1989. 974p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2ª ed. Nova Odessa, SP : Instituto Plantarum, 2008. p. 33-34

MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 337-350, 2005.

MARINOFF, M. A.; CHIFA, C.; RICCIARDI, A. I. A. Especies hidrófitas y palustres utilizadas como medicinales por los habitantes del norte y nordeste de la provincia del Chaco. **Dominguezia**, Buenos Aires, v. 22, n. 1, p. 15-20, 2006.

MARKHAM, K. R.; MABRY, T. J. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In: **The Flavonoids**. Part 1. HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. New York : Academic Press, 1975. p. 45-77

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos**. Documentos 143. Bélem, PA: EMBRAPA, 2002. 43 p. Disponível em: <<http://www.cpatu.embrapa.br/arquivo/Documentos143-Coleta.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2012.

MAURYA, D. K., DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3369-3373, 2010.

MEKHFI, H.; EL HAOUARI, M.; LEGSSYER, A.; BNOUHAM, M.; AZIZ, M.; ATMANI, F.; REMMAL, A.; ZIYYAT, A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 317-322, 2004.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MEYER, P. Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, *Equisetum ramosissimum*, *Malva parviflora*, *Pennisetum clandestinum* and *Medicago sativa*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p. 145-146, 1989.

MICHELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 2, p. 131-138, 2005.

MILDE, C. A. J. Família Equisetaceae. In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. W.; URBAN, I. **Flora Brasiliensis**, vol. 1, part. 2, fasc. 59, coluna 629-644, 1872. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/taxonCard?id=FB1656>>. Acesso em: 05 jan. 2011

MOLARES, S.; LADIO, A. Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on a regional scale. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 251-260, 2009.

MON'S TEA PARTNERSHIP. Mercedes Flores Garza. **Herbal composition for hemorrhoid treatment**. United States Patent 5869059, 16 jan. 1996, 09 fev. 1999.

MORAES, J. T. **Determinação de valores de referência com intervalos quantitativos para ensaios físico-químicos e perfil químico por CLAE-DAD para controle de qualidade da cavalinha (*Equisetum giganteum* L.)**. 2011. 68p. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

MORALES-OLIVAS, F. J. Papel actual de los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión arterial. **Hipertensión**, v. 25, n. 5, p. 198-204, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3.ed. Hardcover: Wiley, 2009.

NAGAI, T.; MYODA, T.; NAGASHIMA, T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 389-394, 2005.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005.



NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. 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, n. 3, p. 143-147, 1996.

NIPPON ZOKI Pharmaceutical Co., Ltd. Jin-emon Konishi. **Crude drug extract containing soluble silicon**. European Patent 0919238A2, 27 dez. 1998, 02 jun. 1999.

NÓBREGA, G. A. **Pteridófitas da Vegetação Nativa do Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil**. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

NOELLI, F. S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **Diálogos**, DHI/UEM, v. 2, n. 2, p. 177-99, 1998.

NOURHÈNE, B.; NEILA, B.; MOHAMMED, K.; NABIL, K. Sorption isotherms and isosteric heats of sorption of olive leaves (Chemlali variety): experimental and mathematical investigations. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, n. 3, p. 167-175, 2008.

NUNES, G. P.; DA SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; DE SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OH, H.; KIM, D. H.; CHO, J. H.; KIM, Y. C. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 421-424, 2004.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OVALLES, J. F.; FULLER, J. R.; SPINETTI, M. Metals, silica and ahs content of *Equisetum bogotense* H. B. K. and *Equisetum giganteum* L. (Horsetail). **Revista de la Facultad de Farmacia**, Mérida, v. 32, p. 2-4, 1996.

PAGE, C. N. An assessment of inter-specific relation-ships in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **New Phytologist**, v. 71, n. 2, p. 355-369, 1972.

PARK, B.-J.; TOMOHIKO, M. Feruloyl, caffeoyl, and flavonol glucosides from *Equisetum hyemale*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 363-365, 2011.

PATKI, P. S.; SINGH, J.; GOKHALE, S. V.; BULAKH, P. M.; SHROTRI, D. S.; PATWARDHAN, B. Efficacy of potassium and magnesium in essential hypertension: a double-blind, placebo controlled, crossover study. **British Medical Journal**, v. 301, n. 6751, p. 521-523, 1990.

PEÑA, R. C.; LATORRE, I.; DELPORTE, C. Estudio anátomo - morfológico de la hierba de la plata, *Equisetum bogotense* H. B. K., y su posible adulterante *E. giganteum* L. **Anales de la Real Academia de Farmacia**, v. 53, p. 519-527, 1987.

PÉREZ GUTIÉRREZ, R. M.; LAGUNA, G. Y.; WALKOWSKI, A. Diuretic activity of Mexican *Equisetum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n. 2-3, p. 269-272, 1985.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from spray dried powder. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-803, 2010.

PIEKOS, R.; PASLAWASKA, S. Studies on the optimum conditions of extraction of silicon species from plants with water. I. *Equisetum arvense* L. Herb. **Planta Medica**, v. 27, n. 2, p. 145-150, 1975.

PIGOTT, A. **National Collection of *Equisetum***: summary of *Equisetum* taxonomy. Disponível em: <<http://www.btinternet.com/~pigott/equisetum/taxonsum.html>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89-96, 2001.

RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; PALIĆ, R. Composition and Antimicrobial Activity of *Equisetum arvense* L. Essential Oil. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 1, p. 85-88, 2006.

RAUTER, A. P.; MARTINS, A.; BORGES, C.; MOTA-FILIFE, H.; PINTO, R.; SEPODES, B.; JUSTINO, J. Antihyperglycaemic and Protective Effects of Flavonoids on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Phytotherapy Research**, v. 24 (supl.), p. S133-S138, 2010.

REHECHO, S.; URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, J.; VIVAS, L. A.; CALVO, M. I. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 75-85, 2011.

RESÉN, R. Manejo integrado del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) con extractos naturales y fungicidas químicos en el cultivo de la papa en Tierra Blanca de Cartago, Costa Rica. In: Primer Congreso Nacional de Agricultura Conservacionista, 2002, San José, Costa Rica. **Memoria...** San José: Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2002. Disponível em: <[http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/f08-8080\\_135.pdf](http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/f08-8080_135.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2011.

REVILLA, M. C.; ANDRADE-CETTO, A.; ISLAS, S.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 117-120, 2002.

RITCH-KRC, E. M.; THOMAS, S.; TURNER, N. J.; TOWERS, G. H. N. Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 85-94, 1996.

ROBLES-ZEPEDA, R. E.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, C. A.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GÁLVEZ-RUIZ, J. C.; RUIZ-BUSTOS, E. Antimicrobial Activity of Northwestern Mexican Plants Against *Helicobacter pylori*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p.1280-1283, 2011.

RODRIGUEZ, J.; PACHECO, P.; RAZMILIC, I.; LOYOLA, J. I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C. Hypotensive and Diuretic Effect of *Equisetum bogotense* and *Fuchsia magellanica* and Micropropagation of *E. bogotense*. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 3, p. 157-160, 1994.

ROMÁN-LESHKOV, Y.; MOLINER, M.; LABINGER, J. A.; DAVIS, M. E. Mechanism of Glucose Isomerization Using a Solid Lewis Acid Catalyst in Water. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 8954-8957, 2010.

ROZENTSVET, O. A.; DEMBITSKY, V. M.; SAKSONOV, S. V. Occurrence of diacylglyceryltrimethylhomoserines and major phospholipids in some plants. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 401-407, 2000.

RYU, J.-H.; AHN, H.; KIM, J. Y.; KIM, Y.-K. Inhibitory Activity of Plant Extracts on Nitric Oxide Synthesis in LPS-Activated Macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 485-489, 2003.

SAFIYED, S.; FATHALLAH, F.; VAHID, N.; HABIB, S. S.; NABAT, N. Effect of *Equisetum arvense* L. (*Equisetaceae*) in Microalbuminuria and Creatinine Excretion in Streptozotocin-Induced Diabetes in Male Rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 155-159, 2007.

SAKURAI, N.; IIZUKA, T.; NAKAYAMA, S.; FUNAYAMA, H.; NOGUCHI, M.; NAGAI, M. Vasorelaxant Activity of Caffeic Acid Derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*. **Yakugaku Zasshi**, v. 123, n. 7, p. 593-598, 2003.

SALEH, N. A. M.; ABDALLA, M. F. The flavonoids of *Equisetum ramosissimum*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 5, p. 987, 1980.

SALINO, A., ALMEIDA, T. E. Equisetaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB091157>>. Acesso em: 24 março 2012.

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

SANDHU, N. S.; KAUR, S.; CHOPRA, D. Pharmacognostic Evaluation of *Equisetum arvense* Linn. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1460-1464, 2010b.

SCARPA, G. F. Plantas empleadas contra trastornos digestivos en la medicina tradicional criolla del Chaco Noroccidental. **Dominguezia**, Buenos Aires, v. 18, n.1, p. 36-50, 2002.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 115-135, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 15, p. 371-400

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; LOYOLA, J.I.; SIERRA, J.; RETAMAL, R.; RODRIGUEZ, J. Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 4, p. 184-188, 1992.

SCOPEL, M. **Análise botânica, química e biológica comparativa entre as flores das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schlttdl. e avaliação preliminar da estabilidade.** 2005. 256p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SEHNEM, A. Equisetáceas. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. 12p.

SENS, S. L. **Alternativas para a Auto-Sustentabilidade dos Xokleng da Terra Indígena Ibirama.** 2002. 386 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SHAMSA, F.; MONSEF, H.; GHAMOOSHI, R.; VERDIAN-RIZI, M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 17-20, 2008.

SHISEIDO Co. Ltd. YAGI, E.; KOMASAKI, H.; SHIBATA, Y.; NAGANUMA, M.; FUKUDA, M. **Liniment for melanin inhibitors.** United States Patent 5631002, 29 jun. 1995, 20 maio 1997.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** 2002. 279 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SOLEIMANI, S.; AZARBAIZANI, F. F.; NEJATI, V. The Effect of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) in Histopathological Changes of Pancreatic  $\beta$ -Cells in Streptozotocin-Induced Diabetic in Rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 23, p. 4236-4240, 2007.

SONAGLIO, D.; GEORGE, G. O.; PETROVICK, P. R. BASSANI, V. L. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 13, p. 289-326

STOLIAR, C. **Parámetros botánicos y cromatográficos para la monografía farmacopeica de “cola de caballo”, *Equisetum giganteum* L.** 2009. 29 p. Tesina, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Investigaciones, Carrera de Farmacia, Universidad de Belgrano, Buenos Aires, 2009. Disponível em: < [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/271\\_Tesina\\_Stoliar.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/271_Tesina_Stoliar.pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2010.

STOLZE, R. G. **Ferns and Fern Allies of Guatemala**, Part III: Marsileaceae, Salviniaceae, and the Fern Allies (including a comprehensive index to Parts 1, 2 and 3). Chicago : Field Museum of Natural History, 1983. p. 16-20.

SUDAN, B. J. L. Seborrhoeic dermatitis induced by nicotine of horsetails (*Equisetum arvense* L.). **Contact Dermatitis**, v. 13, n. 3, p. 201-202, 1985.

SWARTZ, M. R.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 12-20, 1998.

TAGO, Y.; WEI, M.; ISHII, N.; KAKEHASHI, A.; WANIBUCHI, H. Evaluation of the Subchronic Toxicity of Dietary Administered *Equisetum arvense* in F344 Rats. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 23, n. 4, p. 245-251, 2010.

TAMAKI, M.; NAKASHIMA, M.; NISHIYAMA, R.; IKEDA, H.; HIURA, M.; KANAOKA, T.; NAKANO, T.; HAYASHI, T.; OGAWA, O. Assessment of clinical usefulness of Eviprostat for benign prostatic hyperplasia-comparison of Eviprostat tablet with a formulation containing two-times more active ingredients. **Hinyokika kiyo. Acta urologica Japonica**, v. 54, n. 6, p. 435-445, 2008.

TAN, J.-M.; QIU, Y.-H.; TAN, X.-Q.; TAN, C.-H.; XIAO, K. Chemical constituents of *Equisetum debile*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 9, p. 811-816, 2011.

TEIXEIRA, S. A.; MIRANDA DE MELO, J. I. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. **IHERINGIA - Série Botânica**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 5-11, 2006.

TÉLLEZ, M. G. O.; RODRIGUEZ, H. B.; OLIVARES, G. Q.; SORTIBRAN, A. N.; CETTO, A. A.; RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 182-189, 2007.

TENE, V.; MALAGÓN, O.; FINZI, P. V.; VIDARI, G.; ARMIJOS, C.; ZARAGOZA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 63-81, 2007.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX (IPNI). **Plant Name Query**. The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria, The Australian National Herbarium. Disponível em: <<http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

TOH, D.-F.; NEW, L.-S.; KOH, H.-L.; CHAN, E. C.-Y. Ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/TOFMS) for time-dependent profiling of raw and steamed *Panax notoginseng*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 43-50, 2010.

TROPICOS.ORG. **Name Search: *Equisetum***. Saint Louis: Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Equisetum&commonname=>>>. Acesso em: 24 jan 2012a.

TROPICOS.ORG. ***Equisetum giganteum* L.** Saint Louis: Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/26605511?tab=synonyms>>. Acesso em: 24 jan 2012b.

TRYON, R. M.; TRYON, A. L. **Ferns and allied plants**: with special reference to Tropical America, New York:Springer-Verlag, 1982. 857 p.

VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 181-193, 2004.

VEIT, M.; BAUER, K.; BECKERT, C.; KAST, B.; GEIGER, H.; CZYGAN, F.-C. Phenolic Characters of British Hybrid Taxa in *Equisetum* Subgenus *Equisetum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 1, p. 79-87, 1995a.

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, 1995b.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

VENDRUSCOLO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo: Instituto Anchietao de Pesquisas, n. 56, p. 285-322, 2005.

VIEIRA, G. T.; HUMBERTO, J. L.; DE OLIVIERA, T. T.; NAGEM, T. J.; CECON, P. R.; BRAGA, F. C. Estudo do Extrato Butanólico de *Equisetum giganteum* L. na Síndrome Diabetes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Resumos ...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006. PN-299. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0291-1.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**, Second Edition. Berlin : Springer, 1996. p. 195-245.

WHO - World Health Organization. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Geneva: WHO, 1998.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis**. Stuttgart : Medpharm, 1994. p. 188-191.

WIEDENFELD, H.; ANDRADE CETTO, A.; AMADOR, C. P. Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 4, p. 395-397, 2000.

WRIGHT, C. I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C. I.; KONING, M. M. G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 1-31, 2007.

YATSU, F. K. J.; BORGHETTI, G. S.; BASSANI, V. L. Technological Characterization and Stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté ) Spray-Dried Powder. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 4, p. 413-419, 2011.

YOUNG, D. B.; MCCAIG, R. E.; PAN, Y. J.; GUYTON, A. C. The natriuretic and hypotensive effects of potassium. **Circulation Research**, v. 38, n. 6, supl. 2, p. 84-89, 1976.

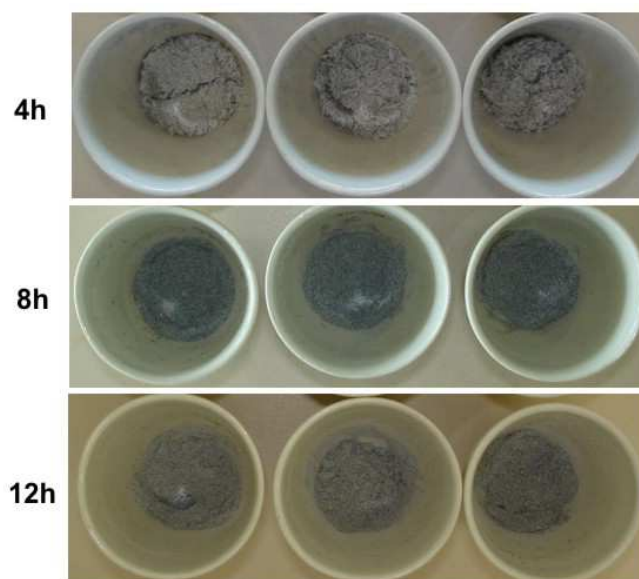


ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T. C. M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2-3, p. 207-215, 2002.

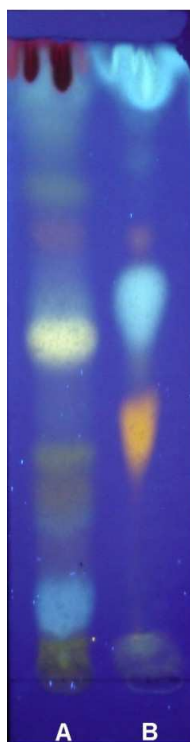
ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M.; RATES, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 25-31, 1999.



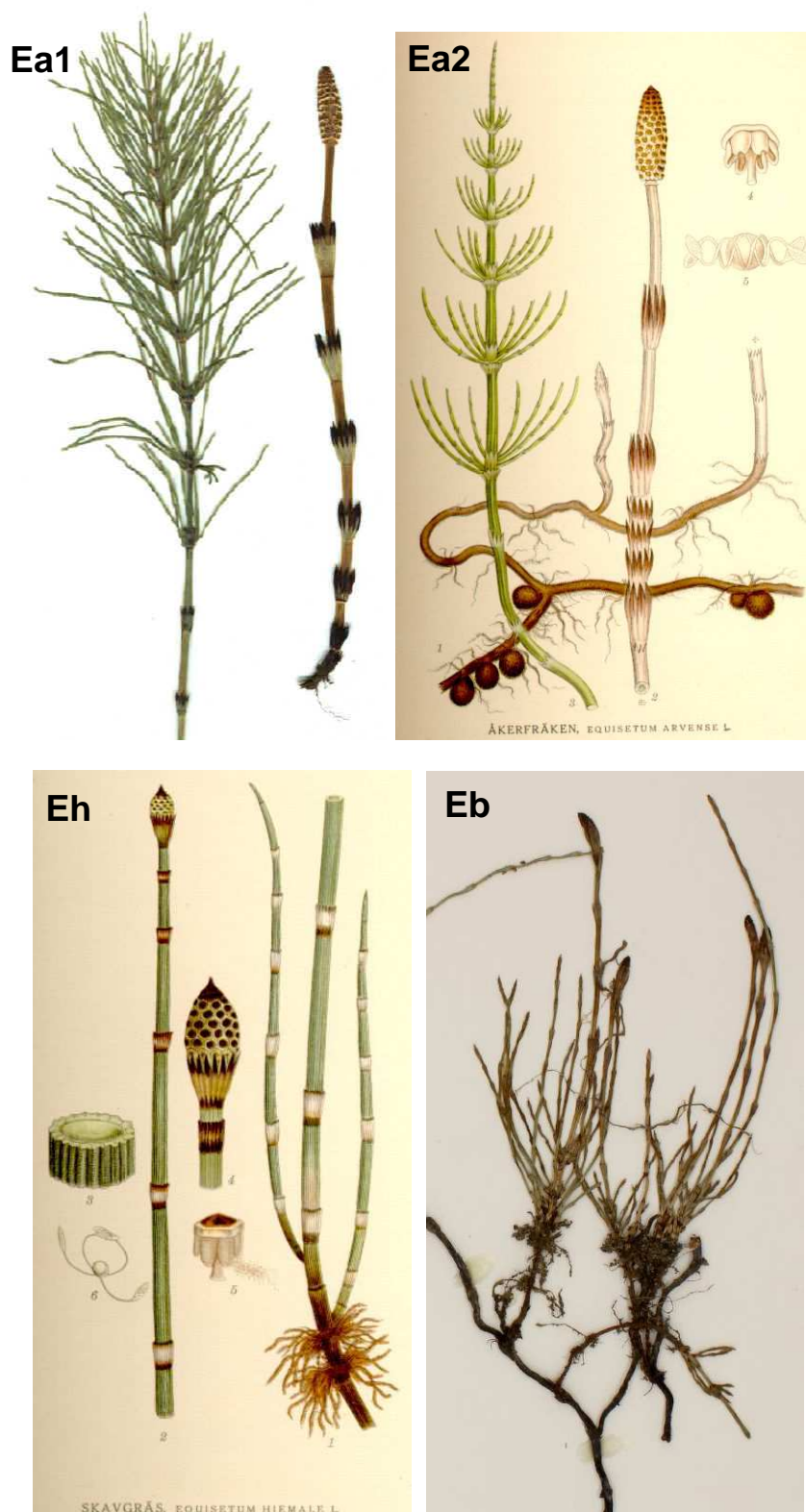




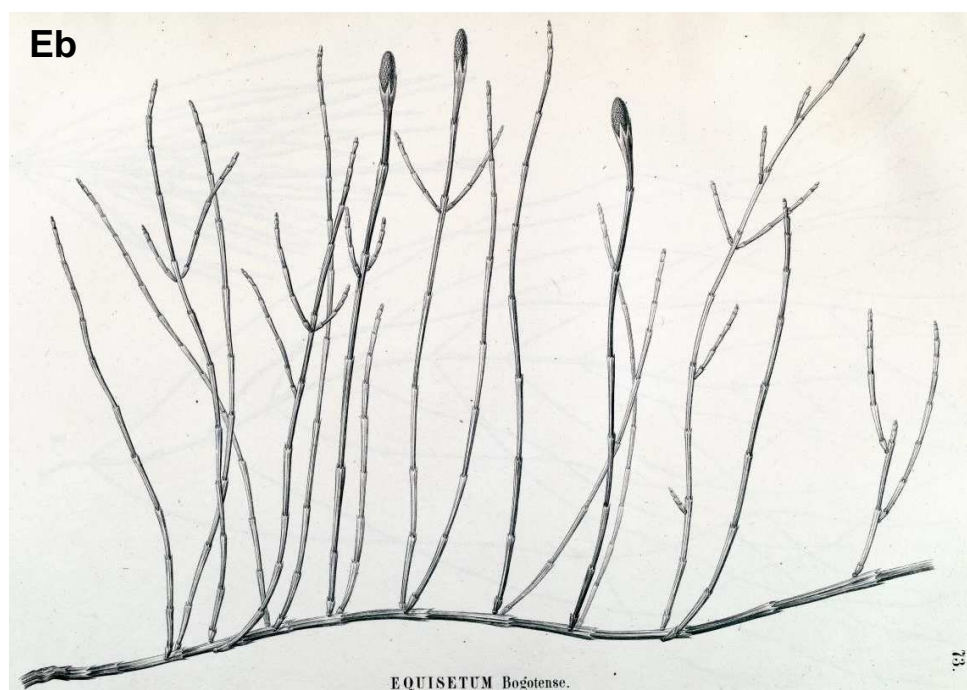
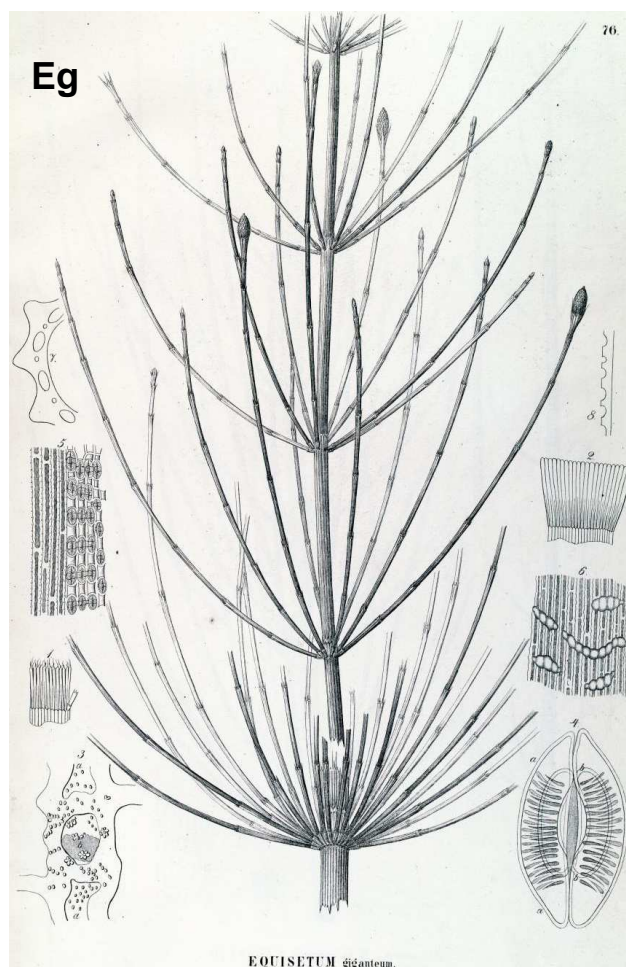
**Figura A1.** Aspecto das cinzas totais nos cadinhos de porcelana, nos tempos 4 , 8 e 12 h de incineração a 600 °C, da amostra proveniente de coleta.



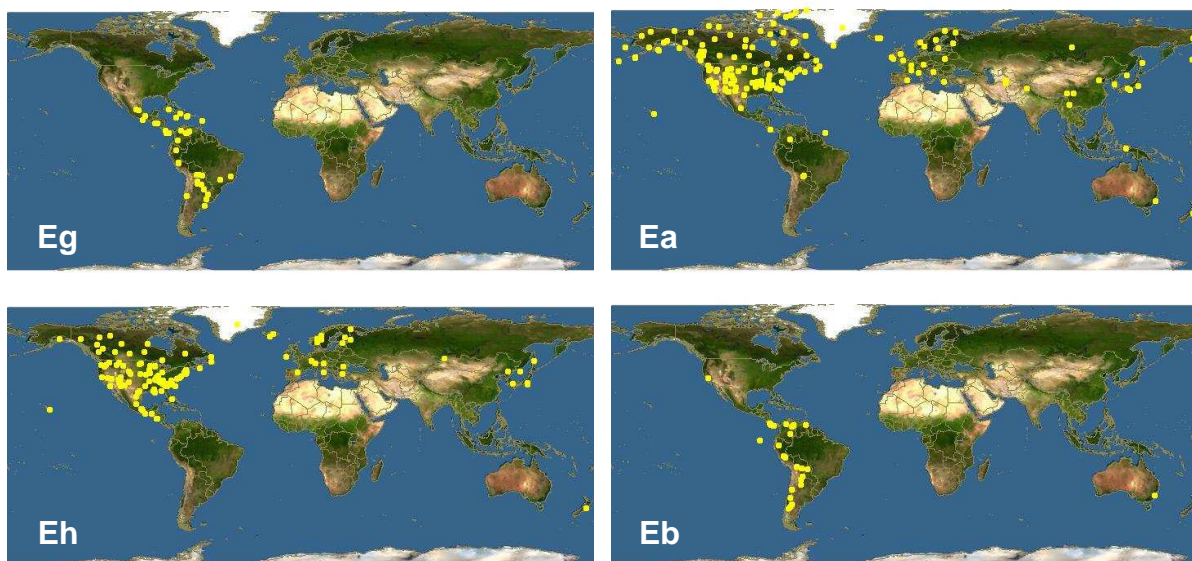
**Figura A2.** CCD do extrato metanólico de *E. giganteum* (A) e substâncias de referência: ácido caféico (Rf 0,95), ácido clorogênico (Rf 0,6) e rutina (Rf 0,4) (B). Fase móvel: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético glacial - água (100:11:11:26, v/v). Detecção: reagente natural / UV 365 nm.



**Figura A3.** Caules vegetativos e reprodutivos de *Equisetum arvense* L., **Ea1** (Fonte: [http://www.lino.com/~vmartino/images/eng/equisetum\\_arvense.htm](http://www.lino.com/~vmartino/images/eng/equisetum_arvense.htm)), **Ea2** (Fonte: <http://runeberg.org/nordflor/515.html>), *Equisetum hyemale* L., **Eh** (Fonte: <http://runeberg.org/nordflor/513.html>) e *Equisetum bogotense* H. B. K., **Eb** (Arizona State University Vascular Plant Herbarium, Fonte: <http://www.madrean.org/maba/symbflora/imagelib/imgdetails.php?imgid=321572>).



**Figura A4.** Aparência geral de *E. giganteum*, **Eg**; e *E. bogotense*, **Eb** (Fonte: MILDE, C. A. J. Família Equisetaceae. In: Flora brasiliensis, Vol. I, Part II, Fasc. 59, Prancha 76 e 73, 1872).



**Figura A5.** Distribuição dos locais de coleta já relatados para *E. giganteum*, **Eg**; *E. arvense*, **Ea**; *E. hyemale*, **Eh**, e; *E. bogotense*, **Eb** (Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2012. Dados de ocorrência da biodiversidade publicados por: Discover Life (Acessado através do GBIF Data Portal, [data.gbif.org](http://data.gbif.org))).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico**

Número: 20368-1		Data da Emissão: 14/05/2009 10:04
Dados do titular		
Registro no Ibama: 4194264	Nome: Leandro Nicolodi Francescato	CPF: 000.817.970-01

**Ressalvas**

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização ou licença do Ibama não exige o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades de pesquisa forem realizadas em área de domínio privado; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva; V) da Fundação Palmares, quando as atividades de pesquisa forem executadas em áreas de Quilombolas; VI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando da entrada e saída de material biológico do País; VII) do Departamento Nacional da Produção Mineral.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

**Táxons registrados**

Nível taxonômico	Táxon(s)
FILO	Equisetophyta

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 56133762**

Página 1/1