



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA COM
INTERVALOS QUANTITATIVOS PARA ENSAIOS FÍSICO-
QUÍMICOS E PERFIL QUÍMICO POR CLASSE PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DA CAVALINHA (*Equisetum
giganteum L.*)**

LONDRINA
2011

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA COM
INTERVALOS QUANTITATIVOS PARA ENSAIOS FÍSICO-
QUÍMICOS E PERFIL QUÍMICO POR CLASSE PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DA CAVALINHA (*Equisetum
giganteum L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Co-orientador: Prof. Dr. César Cornélio Andrei

LONDRINA
2011

JAQUELINE TOBIAS DE MORAES

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA COM
INTERVALOS QUANTITATIVOS PARA ENSAIOS FÍSICO-
QUÍMICOS E PERFIL QUÍMICO POR CLADEAD PARA CONTROLE
DE QUALIDADE DA CAVALINHA (*Equisetum
giganteum L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza
UEM – Maringá - PR

Profª. Dra. Andréa Diniz (Depto de
UEM – Maringá - PR

Londrina, 21 de fevereiro de 2011.

À Deus por tudo.

Ao meu Anjinho da Guarda.
Aos meus Pais, Benedito Tobias de
Moraes Filho e Maria Clarice de Moraes,
por todo amor, carinho, paciência e
principalmente
incentivo.
Aos meus irmãos Leandro e Daniela pelo
amor e carinho.
Ao Beto, que sempre esteve presente me
incentivando.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pelos conhecimentos transmitidos, dedicação, confiança, amizade e incentivo principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. César Cornélio Andrei pela co-orientação e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, sanando dúvidas e cedendo equipamentos para as análises.

A Profa. Dra. Andréa Diniz, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

A Profa. Dra. Gisely Cristiny Lopes pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho principalmente com contribuições na parte da fitoquímica.

Ao Jurandir Pereira Pinto pelo auxílio com os experimentos da Cromatografia Preparativa.

Ao Prof. Dr. Norberto Peoporine Lopes da FCFRP - USP por ceder o LC/MS/MS para as análises dos extratos.

Ao José Carlos Tomas e a Dayana Rúbio da FCFRP - USP pelo auxílio com os experimentos do LC/MS/MS.

A CAPES por um ano de bolsa concedida.

A Universidade Estadual de Londrina.

Aos colegas de Laboratório Matheus, Francys, Felipe, Julia, João e Elis, que também foi minha colega de Pós graduação.

Aos Colegas de Sala.

A todos que com boa intenção colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

MORAES, Jaqueline Tobias de. **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. 68fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A *Equisetum giganteum* L. também conhecida popularmente como cavalinha, rabo de cavalo ou rabo gigante é da família *Equisetaceae* e tem sua origem na América do Sul. Em fitoterapia é normalmente consumida na forma de chá da *Equisetum arvense*, feito de suas partes aéreas. Seu chá é considerado diurético, hemostático e adstringente, sendo utilizado para: diarreia, gonorréia e tratamentos de pedra nos rins, por conter grandes quantidades de alcalóides, saponinas e flavonóides, tais como flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavanóides. O presente trabalho teve como objetivo determinar valores de referências, fixando intervalos quantitativos para ensaios físico-químicos da droga vegetal, efetuar a caracterização fitoquímica, e estabelecer perfil químico dos extratos etanólico e aquoso para a espécie *Equisetum giganteum*, ainda não descritos na literatura, visando o controle de qualidade, baseando-se na padronização das matérias-primas, para assegurar a conformidade dos produtos fitoterápicos. A planta analisada foi coletada na cidade de Londrina-PR e sua exsiccata está catalogada sob o código FUEL-46180 mantida no herbário da Universidade Estadual de Londrina. Os ensaios físico-químicos foram baseados em métodos de análise empregados para outras espécies, já descritas na farmacopéia e por outros autores. O teor de umidade determinado por estudos gravimétricos, empregando-se estufa foi de $10,91 \pm 1,60\%$, e balança de infravermelho foi de $11,38 \pm 0,23\%$. O teor de cinzas totais foi de $5,64 \pm 0,35\%$ e de $14,41 \pm 0,57\%$ para as cinzas insolúveis. O teor extrativo foi de $16,79 \pm 1,84\%$ empregando água como solvente; de $24,09 \pm 1,29\%$ para a extração com álcool 50%; de $29,03 \pm 0,78\%$ para o álcool 70%, e de $12,60 \pm 0,49\%$ para o etanol 100%. Os ensaios qualitativos de caracterização fitoquímica da droga vegetal da *E. giganteum* mostraram-se: negativos para antraquinona, alcalóides e fenólicos simples, e positivos: para os polifenóis totais, saponinas, flavonóides totais e cumarinas; apresentando teores de $0,96 \pm 0,07\%$ (m/V) de polifenóis totais e $0,68 \pm 0,07\%$ (m/V) de flavonóides totais. O método desenvolvido empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD) apresentou-se repetitivo e permitiu estabelecer impressão digital pelo perfil químico do extrato etanólico e aquoso da droga vegetal, bem como encontrar marcador químico para avaliar a estabilidade do extrato etanólico submetido à hidrólise ácida. Os extratos etanólico e aquoso apresentaram elevada capacidade antioxidante com 150 e 179 mmol L^{-1} de Trolox, respectivamente.

Palavras Chaves: *Equisetum giganteum*. CLAE-DAD. Fitoterápico. Caracterização fitoquímica. Impressão digital.

MORAES, Jaqueline Tobias de. **Determination of reference values with quantitative ranges for physicochemical experiments and chemical profile by HPLC-PAD to quality control of cavalinha (*Equisetum giganteum* L.), 2011.** 68fls. Dissertation (Master's degree in Chemistry of Natural Resources) - Londrina State University, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The *Equisetum giganteum* L. also widely known as "cavalinha", ponytail or giant tail belongs to *Equisetaceae* family and has its origins in South America. In phytotherapy this plant is commonly consumed as a tea of *Equisetum arvense* produced with its aerial parts. This tea is considered as being diuretic, haemostatic and astringent, being also appropriated in the treatment of diarrhea, gonorrhoea and kidney stone because it contains big quantities of alkaloids, saponins and flavonoids, such as flavones, isoflavones, flavonols and flavonoids. The objective of this study was to establish specifications nonexistent in literature for the *Equisetum giganteum* specie by physicochemical experiments and by its chemical profile, fixing quantitative ranges to be utilized in its quality control as reference values, aiming to provide standardization of raw material in order to assure conformity to herbal medicine. The plant utilized was collected in the city of Londrina - Paraná, and its exsiccate is cataloged beneath FUEL-46180 code, being maintained in the herbarium of State University of Londrina. The techniques used in physicochemical experiments were the ones already described to other plants in pharmacopoeia and by other authors. The moisture content determined by gravimetric studies, using heater was $10.91 \pm 1.60\%$ (w/w) and $11.38 \pm 0.23\%$ (w/w) to infrared balance. The total ash value was $5.64 \pm 0.35\%$ (w/w) and $14.41 \pm 0.57\%$ (w/w) to insoluble ash. The extractive contents was $16.79 \pm 1.84\%$ (w/w) using water as solvent; $24.09 \pm 1.29\%$ (w/w) to extraction with alcohol 50%(v/v); $29.03 \pm 0.78\%$ (w/w) to extraction with alcohol 70%(v/v); and $12.60 \pm 0.49\%$ (m/m) with 100% of ethanol. The qualitative phytochemical characterization experiments of the *E. giganteum* vegetal drug reveals: negative to antraquinone, alkaloids and simple phenolics, and positive to total polyphenols, saponins total flavonoids and coumarins, presenting contents of $0.96 \pm 0.07\%$ (w/w) of total polyphenols and $0.68 \pm 0.07\%$ (w/w) of total flavonoids. The developed method using High Performance Liquid Chromatography with diode array technique (HPLC-PAD) presented repeatability and enable to establish fingerprint by the chemical profile of the ethanolic and aqueous extract of the vegetal drug, as well as find the chemical marker to evaluate stability of the ethanolic extract submitted to acid hydrolysis. Ethanolic and aqueous extract presented high antioxidant capacity with $150,0 \text{ mmol L}^{-1}$ and $178,9 \text{ mmol L}^{-1}$ of Trolox, respectively.

Key words: *Equisetum giganteum*. HPLC-PAD. Phytotherapics. Phytochemical screening. Fingerprint.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente linear da metodologia desenvolvida por Cromatografia de Fase Líquida.....	41
Tabela 2 - Resultados dos ensaios físico-químicas da droga vegetal da <i>E. Giganteum</i>	44
Tabela 3 - Resultados dos ensaios de caracterização fitoquímica da droga vegetal da <i>Equisetum. Giganteum</i>	46
Tabela 4 - Dados dos picos majoritários obtidos a partir das análises cromatográficas dos extratos aquoso e etanólico da droga vegetal da <i>E. giganteum</i> da Figura 9.....	51
Tabela 5 - Dados dos picos majoritários, obtidos a partir das análises cromatográficas, dos extratos etanólico e etanólico hidrolisado da droga vegetal - <i>Equisetum giganteum</i> da figura14	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos polifenólicos.....	23
Figura 2 - Estabilização do radical livre DPPH	23
Figura 3 - Foto: <i>Equisetum giganteum</i>	26
Figura 4 - (A) parte de um ramo aéreo da <i>Equisetum giganteum</i> e (B) Estróbilo	26
Figura 5 - Organograma das extrações analisadas por cromatografia de fase líquida com arranjo de diodos.....	38
Figura 6 - Reação de fluorescência da cumarina	47
Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos do extrato etanólico da droga vegetal da <i>Equisetum giganteum</i> (n=2).....	49
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos do extrato aquoso da <i>Equisetum giganteum</i> (n=2)	50
Figura 9 - Sobreposição de cromatogramas dos extratos aquoso e etanólico da droga vegetal da <i>Equisetum giganteum</i>	51
Figura 10 - Espectro do pico número 1 com tempo de retenção de 16,88 minutos do extrato etanólico da <i>E. giganteum</i> (Figura 9).....	52
Figura 11 - Espectro do pico número 3 com tempo de retenção de 18,69 minutos da do extrato aquoso da <i>E. giganteum</i> (Figura 9).....	53
Figura 12 - Espectro do pico número 2 com tempo de retenção de 18,21 minutos do extrato etanólico da <i>E. giganteum</i> (Figura 9).....	53
Figura 13 - Espectros do pico número 4 com tempo de retenção de 19,95 minutos do extrato aquoso da <i>E. giganteum</i> (Figura 9).....	54
Figura 14 - Sobreposição de Cromatogramas do extrato etanólico da droga vegetal e do extrato hidrolisado do extrato etanólico da <i>E. Giganteum</i>	54
Figura 15 - Espectro UV do pico número 1 com tempo de retenção de 22,49 minutos do extrato etanólico da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	55
Figura 16 - Espectro UV do pico número 2 com tempo de retenção de 26,67 minutos do extrato etanólico hidrolisado da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	56

Figura 17 - Espectro UV do pico número 3 com tempo de retenção de 35,66 minutos do extrato hidrolisado do extrato etanólico da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	57
Figura 18 - Espectro UV do pico número 5 com tempo de retenção de 36,59 minutos do extrato etanólico da droga vegetal da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	57
Figura 19 - Espectro UV do pico número 4 com tempo de retenção de 36,06 minutos do extrato etanólico da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	58
Figura 20 - Espectro UV do pico número 6 do com tempo de retenção de 37,00 minutos do extrato etanólico hidrolisado da <i>E. giganteum</i> (Figura 14).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BPF	Boas Práticas de Fabricação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coefficiente de Variação
dp	Desvio Padrão
SETI	Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior
ICH	International Conference on Harmonization
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MS	Espectro de Massa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV/VIS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Ultravioleta-Visível
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectro de Massa
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
	EMA - Agência Europeia de Medicamentos WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 PLANTA MEDICINAL, DROGA VEGETAL E FITOTERÁPICO	15
2.2 PROGRAMA DE FITOTERAPIA NO SUS	17
2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL	18
2.4 <i>EQUISETUM</i>	24
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVO	28
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
5.1 EQUIPAMENTOS	29
5.1.2 Solventes e Reagentes	29
5.2 MATERIAL VEGETAL	30
5.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS	30
5.3.1 Determinação do Teor de Umidade por Estufa	30
5.3.2 Determinação do Teor de Umidade por Balança de Infravermelho	31
5.3.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais	31
5.3.4 Determinação de Cinzas Insolúveis	32
5.3.5 Determinação de Teor de Substâncias Extraíveis	32
5.4 ENSAIOS FITOQUÍMICOS QUALITATIVOS DA DROGA VEGETAL	33
5.4.1 Determinação de Flavonóides	33
5.4.2 Determinação de Cumarina	33
5.4.3 Determinação de Taninos	33
5.4.4 Determinação de Antraquinonas	34
5.4.5 Determinação de Saponinas	34
5.4.6 Determinação de Alcalóides	34
5.4.7 Determinação de Fenólicos Simples	35

5.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS QUANTITATIVOS DA DROGA VEGETAL	35
5.5.1 Determinação de Polifenóis Totais	35
5.5.2 Determinação do Teor de Flavonóides Totais	36
5.6 DETERMINAÇÃO DA IMPRESSÃO DIGITAL PELO PERFIL QUÍMICO DA DROGA VEGETAL	37
5.6.1 Preparo do Extrato Aquoso	39
5.6.2 Preparo do Extrato Etanólico	39
5.6.3 Hidrólise do Extrato Etanólico	39
5.6.4 Condições Analíticas para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE-DAD	40
5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
6 RESULTADOS E DICUSSÃO	44
6.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	44
6.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	46
6.3 IMPRESSÃO DIGITAL COM PERFIL DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO OBTIDOS DA DROGA VEGETAL	49
6.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO OBTIDOS A PARTIR DA DROGA VEGETAL.....	59
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO	67
ANEXO A - Preparo das soluções utilizadas nas análises de caracterização fitoquímica.	68

1 INTRODUÇÃO

A idéia desta pesquisa surgiu a partir do Projeto de Extensão no. 01391 da Universidade Estadual de Londrina intitulado "Sistema Cooperativo de Cultivo de Plantas Medicinais e Produção Industrial de Fitoterápicos", iniciado em 01/12/08 e concluído em 31/12/10.

Este Projeto, financiado pela Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná (SETI), como parte integrante do Projeto "Universidade sem Fronteiras", visava orientar tecnicamente agricultores do assentamento "Iraci Salete" em Alvorada do Sul - PR, município eleito por apresentar baixo índice de desenvolvimento humano (IDH), com o objetivo de promover o cultivo de plantas medicinais, voltado à produção de fitoterápicos.

O referido Projeto multidisciplinar envolveu os Departamentos de Agronomia, Ciências Farmacêuticas e Administração da UEL, bem como, a Incubadora Tecnológica de Empreendimentos Solidários - INTES/UEL. Teve como foco principal a produção de plantas medicinais com a avaliação da qualidade das matérias-primas vegetais, para o uso medicinal ou alimentar.

O Projeto baseou-se na premissa de que as matérias-primas vegetais, com garantia de qualidade desde a 1ª etapa de seu processo produtivo, agregam valor econômico ao produto, facilitando sua comercialização, o que propiciaria as famílias de agricultores, uma alternativa de renda viável, gerando melhoria na qualidade de vida e no desenvolvimento local dos envolvidos. Dentre as várias plantas medicinais selecionadas neste projeto, foi também escolhida a planta popularmente conhecida como Cavalinha da espécie *Equisetum giganteum*, levando-se em consideração à facilidade do seu cultivo, bem como, o fato de ser flora nativa da região e ainda apresentar uso popular, consumida como chá, na forma de infusão de suas partes aéreas.

No entanto, na fase de levantamento bibliográfico, observou-se que não havia muitos estudos científicos quanto a ações farmacológicas e composição química para a *Equisetum giganteum*. Essa falta de informação consistia em uma dificuldade, para o estudo comparativo de parâmetros físico-químicos, químicos e farmacológicos inter-espécies do gênero.

Verificou-se ainda que a *Equisetum giganteum* não estava inserida em nenhuma farmacopéia ou código oficial, o que representaria um desafio e

demandaria um esforço adicional em relação às pesquisas, para estabelecer especificações, a serem utilizadas no controle de qualidade da droga vegetal a ser comercializada, especialmente considerando o ineditismo, e frente ao relativo exíguo tempo para conclusão do Mestrado.

Portanto, dada à falta de informações sobre esta espécie, como um desafio, resolveu-se efetuar análises desta planta, a fim de se determinar intervalos quantitativos a serem tomados como valores de referência para os principais parâmetros, visando assegurar sua qualidade. Procurando-se desta forma, evitar tanto prejuízos de ordem econômica, bem como, garantindo o aspecto de segurança alimentar e sanitária, com o intuito de não prejudicar a população que fizesse o uso desta planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTA MEDICINAL, DROGA VEGETAL E FITOTERÁPICO

Medicamentos fitoterápicos, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido a partir de matérias-primas ativas exclusivamente vegetais (BRASIL, 2004). É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO et al., 2008).

Os fitoterápicos representam uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém estima-se que esse mercado gire em torno de US\$ 160 milhões por ano. O fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internamente, mais de 15% anuais, contra 4% de evolução das vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (FRANÇA, 2010).

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária dos produtos e serviços (CARVALHO et al., 2008).

Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, que exige que sejam avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem colocados à venda para utilização pela população (CARVALHO et al., 2008).

A ausência de adequação ou de metodologia de pesquisa normatizada para avaliar as plantas medicinais tem-se constituído em um importante obstáculo para os pesquisadores (LAN et al., 2010). Existem problemas quanto à garantia de qualidade dos medicamentos fitoterápicos, porque os componentes bioativos reais das plantas, raramente são conhecidos (CHAN, 2003), por apresentarem composição química muito complexa.

Segundo Xie et al. (2007) como os extratos das plantas medicinais apresentam-se muito complexos, é difícil caracterizar completamente todos os compostos químicos presentes, e também é igualmente difícil saber com precisão,

qual composto químico da droga vegetal é responsável pela ação terapêutica, pois estes compostos muitas vezes podem atuar sinergicamente nesses efeitos terapêuticos.

Nos últimos anos, esforços significativos têm sido feitos no sentido de desenvolver métodos para o controle de qualidade dos materiais à base de plantas, bem como extratos de plantas medicinais, utilizando métodos quantitativos e/ou qualitativos como o método de impressões digitais, que emprega a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Ambos os métodos, os qualitativos e os quantitativos, têm suas vantagens e desvantagens. Na análise quantitativa, por exemplo, uma grande desvantagem, é a dificuldade em determinar o principal componente químico para o controle de qualidade da matéria prima vegetal (XIE et al., 2007). Embora algumas plantas estejam descritas nas farmacopéias com suas monografias, especialmente os marcadores químicos e as impressões digitais das plantas, ainda não foram abrangidos nestas monografias (YADAV; DIXIT, 2008), e ainda existe a dificuldade em encontrar os padrões analíticos comerciais, justamente pela dificuldade de isolamento dos componentes químicos.

Plantas medicinais constituem uma das formas mais antigas de cuidar da saúde empregada pela humanidade. Até o começo do século XIX, o conhecimento destes recursos era de cunho empírico e o seu uso se restringia às formas de pó de planta, extratos simples ou tinturas. Nessa mesma época, teve início uma nova fase na história da medicina, caracterizada pelo isolamento e identificação química de compostos farmacologicamente ativos, a partir das drogas vegetais (BORGES, 2005).

Praticamente todos os povos ou etnias do mundo usam plantas medicinais, ou seus derivados, de forma direta ou indireta para o tratamento de males que acometem o homem e/ou para atingir o estado de completo bem-estar físico, mental e social (MELO, 2007).

Durante o século XX, o avanço na área científica e principalmente da indústria farmacêutica fez com que o número de medicamentos aumentasse significativamente.

Os novos fármacos trouxeram benefícios significativos, no entanto, com a promessa de cura ou alívio imediato dos sintomas, passou-se a observar freqüentemente, a utilização abusiva deste recurso e, apesar do grande desenvolvimento da indústria farmacêutica, ainda há um grande número de

doenças, para as quais a terapia medicamentosa convencional é ineficaz e apresenta efeitos iatrogênicos importantes, que são efeitos adversos associados ao medicamento (BORGES, 2005).

A planta medicinal é uma espécie vegetal que possui substâncias biologicamente ativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. São todos os vegetais que oferecem efeito terapêutico para uma ou mais patologias, pela planta como um todo ou de alguma parte da planta denominada tecnicamente de droga vegetal. A expressão droga vegetal designa determinada parte da planta medicinal ou a planta medicinal como um todo, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, triturada ou pulverizada, que possui os princípios ativos com as propriedades terapêuticas, podendo ser qualquer parte da planta, como: casca, folha, flor, fruto, raiz ou semente (BRASIL, 2004).

O medicamento fitoterápico é obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, podendo ser comercializado em suas mais variadas formas farmacêuticas desde: pomadas, xaropes, comprimidos, cápsulas, tinturas, droga vegetal desidratada, ou mesmo "in natura", colhido direto da planta com o objetivo de produzir uma forma a ser consumida (VIEIRA, 2008).

2.2 PROGRAMA DE FITOTERAPIA NO SUS

O aumento da capacitação de recursos humanos nas universidades públicas tem proporcionado a possibilidade do desenvolvimento de tecnologia aplicável aos fitoterápicos visando à utilização desses medicamentos nos programas governamentais de saúde pública (CAMARGO, 2010).

Com isso, o Sistema Único de Saúde (SUS) implantou a fitoterapia no seu plano de assistência de saúde a população brasileira, por meio do decreto no. 5813 de 22 de junho de 2006, que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Desta forma, ficou estabelecido um programa de inserção, de uma fitoterapia racional e científica para a população brasileira, com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

As diretrizes aprovadas na Política Nacional de Medicamentos contemplam basicamente: a regulamentação sanitária de medicamentos

fitoterápicos e plantas medicinais; a adoção da relação de medicamentos que são importantes para a utilização com algum benefício à saúde; a reorientação da assistência farmacêutica; a promoção do uso racional de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais; o desenvolvimento científico e tecnológico; a promoção da produção de medicamentos fitoterápicos; a garantia da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos para utilização pela população; e o desenvolvimento e capacitação de recursos humanos na área. Ainda existe, a inclusão da agricultura familiar nas cadeias e nos arranjos produtivos das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos. Essas diretrizes devem promover o acesso da população a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade, ao menor custo possível (BRASIL, 2006).

No entanto, mesmo com o incentivo de uma Política Nacional, parece ainda haver carência de informação e de ações no sentido da efetiva implementação dessa prática terapêutica no Sistema de Saúde brasileiro.

Além do mais, faltam estudos para a comprovação científica da eficácia e segurança da utilização dessas plantas como medicamento, sendo que a grande maioria continua a ser utilizada apenas com base no conhecimento do seu uso popular (DUTRA, 2009).

Diante de um programa completo e ao mesmo tempo complexo, o dimensionamento das iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil visam viabilizar a utilização racional, tanto de plantas medicinais como de fitoterápicos, com linhas condutoras de preservação da biodiversidade e desenvolvimento sustentável (VIEIRA, 2008).

2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada, para cada grupo de princípio ativo a ser extraído, e para cada doença a ser tratada, existem formas de preparo e usos adequados (DUTRA, 2009).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso a qual se destina, portanto a qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico (SIMÕES et al., 2001).

O controle de qualidade, a padronização e a estabilização dos

medicamentos fitoterápicos constituem uma tarefa bastante complexa, embora, atualmente possível em função dos avanços crescentes atingidos nos métodos analíticos de alta resolução, com técnicas que permitem o isolamento e a identificação dos constituintes químicos, mesmo presentes em baixíssimas concentrações nas plantas (GUIMARÃES, 2007).

A garantia do uso seguro e eficaz de fitoterápicos envolve análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA et al, 2006).

Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal, a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas a base de plantas ainda são escassos na literatura (BARA et al, 2006).

Poucos fitoterápicos foram validados cientificamente visando à comprovação da eficácia clínica e à avaliação de sua segurança (GUIMARÃES, 2007). Por isso, a segurança da utilização das plantas medicinais ou de seus produtos acabados passa a ser questionada, por causa da falta de controle de qualidade, desde a aquisição da matéria prima até o produto acabado, além da escassez de metodologias adequadas para a avaliação destes produtos. Conseqüentemente, muito dos produtos fitoterápicos apresentam riscos diversos, como por exemplo: identificação errônea da planta, presença de constituintes tóxicos, preparação inadequada e estocagem do material vegetal, adulteração durante o condicionamento, presença de contaminantes biológicos e abióticos, entre outros (LEÃO, 2010).

A validação da metodologia analítica é de grande importância para a Garantia da Qualidade Analítica e se constitui numa das exigências das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes (OLIVEIRA, 2006).

Os métodos de ensaio para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (OLIVEIRA, 2006).

As técnicas analíticas podem ser aplicadas em diferentes fases das boas práticas da garantia de qualidade dos produtos naturais ou à base de plantas (CHAN, 2003).

A análise qualitativa pode ser usada para demonstrar as

características gerais dos materiais à base de plantas no que diz respeito à coerência e à qualidade de estabilidade. A análise quantitativa tem como objetivo quantificar os compostos marcadores da droga vegetal ou plantas medicinais, e então usá-los como indicadores ou padrões para avaliar a qualidade (LI et al., 2008).

A padronização de fitoterápicos pode ser realizada em base a concentração de um princípio ativo único ou através de uma substância marcadora presente em um extrato concentrado. No caso da padronização, por meio de uma substância marcadora, assume-se que se a mesma está presente numa quantidade apropriada, também todos os demais componentes necessários estão igualmente representados, assegurando-se, com isto, uma atividade farmacológica uniforme (GUIMARÃES, 2007).

Determinar o principal componente químico ou marcadores químicos e os compostos tóxicos são cruciais para a o controle de qualidade dessas drogas vegetais (LI et al., 2008), uma vez que dos extratos brutos da planta, obtêm uma mistura complexa de constituintes químicos, cujos níveis podem apresentar variações consideráveis, dependentes ainda de fatores ambientais e/ou genéticos (BORGES, 2005).

A eficácia de um medicamento é dada pela comprovação, por ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos e de contaminantes nocivos à saúde, como, por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos metabólitos, produtos da degradação, entre outros (BRASIL, 2007).

Muitas técnicas estão sendo utilizadas para o controle de qualidade das drogas vegetais. Como exemplo, podemos destacar a análise de impressão digital que indica a presença de marcadores químicos múltiplos dentro de uma amostra (LI et al., 2008). Esta técnica auxilia na autenticação e identificação do fitoterápico, podendo a análise ser conduzida de forma confiável, mesmo que a qualidade e quantidade dos constituintes sejam desconhecidos (XU et al., 2006).

A Agência Européia de Medicamentos (EMA) aceita como apropriada a análise de impressão digital para a identificação das drogas vegetais (YANG et al., 2005). Por sua vez, a análise de impressão digital das drogas vegetais foi introduzida e aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma estratégia para a avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos (NI et al.,

2009).

Além das análises de impressão digital que empregam a Cromatografia Líquida na região do espectro Ultravioleta-Visível (CLAE-UV/Vis), também podem ser empregadas outras técnicas como: Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que são técnicas rápidas e que oferecem grande potencial para o monitoramento da qualidade dos materiais à base de plantas, particularmente para a identificação de uma planta em particular e distingui-la de espécies intimamente relacionadas (XIE et al., 2007).

A identificação dos constituintes químicos das drogas vegetais também é importante para o controle de qualidade dos fitoterápicos. A técnica de CLAE-EM tem aumentado a sua popularidade com o desenvolvimento da interface de massas. O método baseia-se na fragmentação e medição da relação massa carga (m/z) dos compostos detectados, após separação no sistema cromatográfico, que torna possível o estudo da estrutura dos compostos de interesse e sua identificação. Para isso, utilizam-se os métodos cromatográficos gasosos ou líquidos hifenados com acoplamentos a espectrômetros de massas (CG-EM ou CLAE-EM do inglês GC-MS 'Gas Chromatography with Mass Spectrometry' ou HPLC-MS 'High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry'), e métodos espectroscópicos como: a espectroscopia de ultra-violeta (UV), espectroscopia no infravermelho (IR), espectroscopia Raman, espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massas (EM), e difração de raios X (CHAN, 2003).

No entanto, o equipamento de HPLC-MS ainda é caro, e não é muito comum nos laboratórios de controle e pesquisa. Segundo Quirós et al. (2009), o uso de detectores de UV-Vis e fluorescência poderiam ser uma excelente alternativa, quando LC-MS não está disponível. A alta seletividade do detector de fluorescência ajudaria na identificação e distinção de substâncias diferentes. Contudo a técnica de HPLC com detector de arranjo do diodo (PAD) é uma das mais utilizadas, pois esse tipo de detector permite a identificação e quantificação nas menores concentrações de analitos, e a comparação dos espectros em comprimentos de onda desejados.

O controle de qualidade do fitoterápico exige que as informações estejam descritas para a população que utilizará o mesmo; de acordo com as orientações da OMS para a investigação da avaliação, segurança e eficácia dos fitoterápicos. O estabelecimento de especificações para o padrão dos medicamentos

fitoterápicos deve incluir o nome da planta, descrição de origem e definição, identificação, pureza (incluindo corpo estranho), metais pesados, cinzas, umidade, determinação de componentes principais, e estabilidade no armazenamento (CHOI et al., 2002).

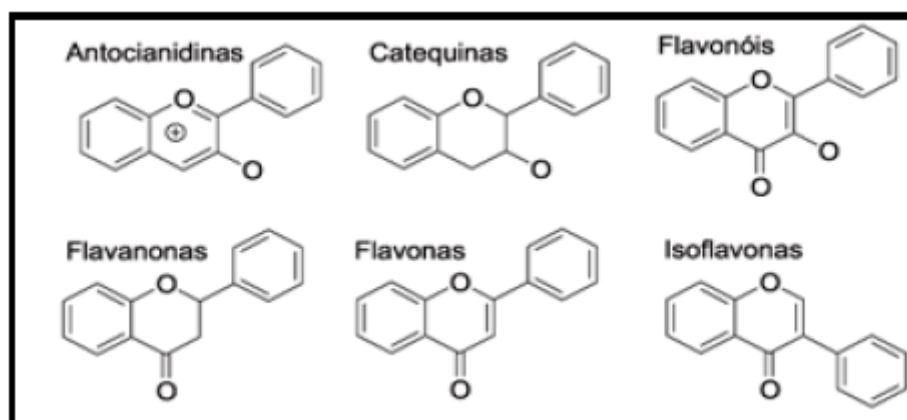
Várias pesquisas apontam os benefícios dos compostos polifenólicos, devido as suas atividades antioxidantes, antiinflamatórias e anticarcinogênicas (YANG et al., 2001; LAMBERT et al. 2005; ADEMAMOWO et al., 2005). O mecanismo de quimioproteção está focado na atividade biológica dos compostos encontrados em folhas verdes de vegetais, conhecidos como fitocompostos, representado grande promessa para prevenção de doenças crônicas (SANTANA, 2008).

Denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. A capacidade antioxidante atua de forma a combater o estresse oxidativo, interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando ou reparando as lesões (BIACHI, 1999). Os radicais formados a partir dos antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUZA, 2007).

A reatividade dos compostos fenólicos advém de uma característica estrutural comum a todos eles, que é a presença de um anel aromático hidroxilado. A forma mais simples destes compostos químicos é o fenol, que assim dá o nome a esta série, sendo os outros compostos são derivados desta estrutura básica comum (CABRITA et al., 2004).

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (ZOECKLEIN et al., 1995). Podem encontrar-se no estado livre ou polimerizados com outros flavonóides, açúcares, não flavonóides, ou ainda outras combinações (CABRITA et al., 2004) (Figura 1).

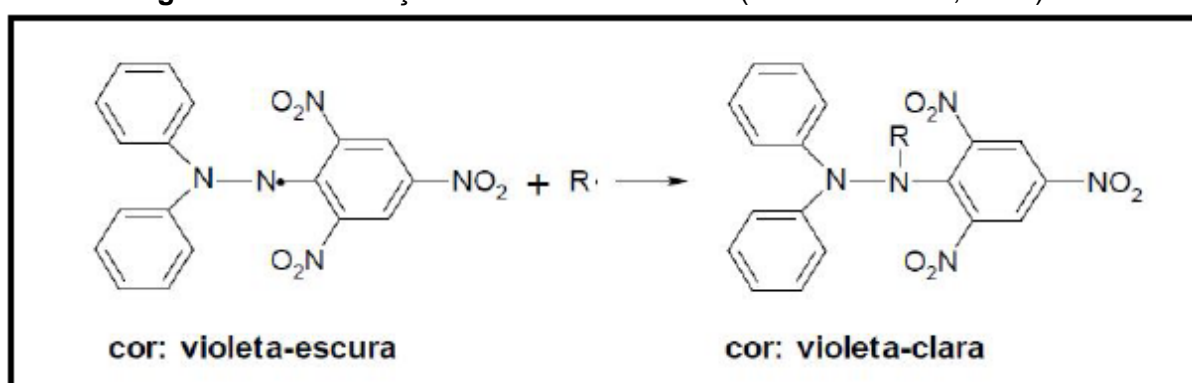
Figura 1 – Compostos polifenólicos (CABRITA, 2004).



Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* destacando-se o método de seqüestro de radicais livres, tal como DPPH» (DUARTE ALMEIDA, 2006). A determinação da capacidade antioxidante é feita pelo método espectrofotométrico de seqüestro de radicais livres, este método está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH» de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) (Figura 2).

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico.

Figura 2 - Estabilização do radical livre DPPH (Fonte: RUFINO, 2007).



2.4 EQUISETUM

As espécies do gênero *Equisetum* pertencem à família *Equisetaceae*.

São nativas da América do norte, presentes do Alasca até o sul da Califórnia e em toda Europa e nas ilhas Britânicas. No Brasil podem ser encontradas em toda região central (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (FERREIRA, 2001).

Essas espécies geralmente requerem condições úmidas para seu crescimento, mas podem persistir em ampla variedade de climas, devido a uma série de adaptações que ajudam a aumentar a eficiência do uso da água, como uma camada impermeável externa, hastes verdes e poros especiais nas folhas. Em áreas mais secas as plantas reduzem muito o tamanho de suas folhas a fim de minimizar a perda de água. A maioria das espécies se desenvolve em áreas pantanosas como as margens de lagos, rios e riachos. Crescem em muitos tipos de solo e podem tolerar baixos níveis de nutrientes (TROUNCE et al., 2003).

As espécies de *Equisetum* podem apresentar como característica grande quantidade de sílica em até 25% do total do peso da planta seca (SAPEI et al, 2008).

Existem várias espécies do gênero *Equisetum* em todo o mundo, podendo variar em sua distribuição geográfica, composição química, e ação farmacológica.

A *Equisetum arvensis* é conhecida como rabo comum (TROUNCE et al., 2003), originária da Europa, Ásia e América do Norte (VAZ; JORGE, 2006). Alguns estudos desta espécie mostraram atividade hipoglicêmica, diurética, antiinflamatória, anti-séptica, vaso relaxante e hemostática (MEKHFI et al., 2004).

A *Equisetum hyemale* apresenta uso popular do chá do caule com atividade diurética e de combate à hiperlipidemia (aumento da concentração de lipídios no sangue) (BOCARDI, 2008).

A *Equisetum myriochaetum* é uma planta de distribuição do sul ao centro do México, popularmente conhecida como "Cola de caballo" (TÉLLEZ et al., 2007), muito utilizada para tratar doenças renais e alguns estudos desta espécie mostraram-se positivos para o tratamento de diabetes tipo II (WIEDENFELD; CETTO; AMADOR, 2000).

Segundo Kanchanapoom, Otsuda e Ruchirawat (2007) a *Equisetum debile* é muito utilizada na medicina tradicional tailandesa com finalidades diuréticas.

De acordo com Yesilada e Gurbuz (2010) na Turquia as partes aéreas da *Equisetum palustre* são utilizadas para tratar úlcera péptica.

Segundo estudos de Danielski; Michielin e Ferreira (2007) a *Equisetum giganteum* tem sido utilizada em fitoterapia, como substituto fácil da *Equisetum arvense* (MICHIELIN et al, 2005), normalmente consumida como chá, produzido com sua parte aérea.

O chá da *Equisetum giganteum* é considerado diurético, hemostático e adstringente, sendo também adequado para a diarreia, gonorréia e tratamentos de pedra nos rins.

A *Equisetum giganteum* por apresentar elevado teor de minerais, também é recomendada para a revitalização das unhas e cabelos sem vida (DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007). De acordo com Barros et al., (2007) ainda é utilizada para tratar doenças do estômago como gastrite.

A *Equisetum giganteum* da família *Equisetaceae*, mostrada na Figura 3, é conhecida popularmente como rabo de cavalo ou rabo gigante ou Cavalinha (DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007), com sua origem na América do Sul (CAVALAZZI, 2006).

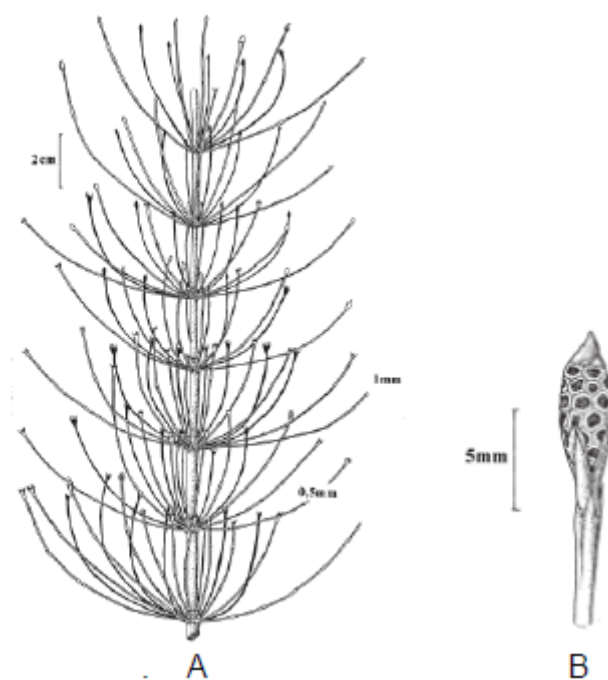
Segundo descrição de Nóbrega e Prado (2008) a *Equisetum giganteum* é uma planta terrestre, que apresenta caule da parte aérea oca, ramo principal verde, ramificado verticiladamente, envolvidos externamente por uma bainha de folhas vestigiais e internamente por uma membrana como mostrada na Figura 4A. Observando-se a Figura 4B, é possível verificar que possui ramos em verticilos regulares, perpendiculares a ascendentes, com nós e entre-nós, similares aos do ramo principal; bainha de folhas vestigiais, aclorofiladas, envolvendo o ápice de cada entre nó. No ramo principal, o ápice apresenta prolongamento em forma de escama, escura no centro de nervura única. Nas extremidades dos ramos tem estróbilos apicais mucronados e esporângios sésseis, sobre esporangióforos peltados.

Figura 3 - Foto *Equisetum giganteum*



Fonte: Husby (2008)

Figura 4 – (A) parte de um ramo aéreo da *Equisetum giganteum* e (B) Estróbilo.



Fonte: Nóbrega e Prado (2008)

3 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais ou os fitoterápicos, como forma de tratamento à saúde (CAMARGO, 2010).

O uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde em 1978, que recomendou a difusão, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o seu uso (CAMARGO, 2010).

Uma vez, que a má qualidade de um produto pode interferir na ação farmacológica preconizada para a espécie, potencializando efeitos indesejáveis; que muitas plantas medicinais nativas são advindas de populações silvestres, que sofrem ameaças, podendo levá-la a extinção (MELO, 2007); que há ausência de comprovações científicas; e ainda, devido à dificuldade no controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais, a credibilidade dos fitoterápicos fica restringida (LEÃO, 2010).

Devido à necessidade da obtenção de parâmetros que norteiem o controle de qualidade da *Equisetum giganteum* (Cavalinha), uma vez que esta planta, embora praticamente sem estudos científicos de caracterização, possui uso popular, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios físico-químicos, já descritos na farmacopéia para outras plantas, a fim de se determinar intervalos quantitativos que sirvam de base para serem aplicados como valores de referência analíticos. Inicialmente foi realizada a caracterização fitoquímica, quali e quantitativa. Para a caracterização química qualitativa e estudo da estabilidade da droga vegetal foi desenvolvido um método de separação empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD), buscando a impressão digital da *Equisetum giganteum* pelo perfil químico, a fim de encontrar marcadores químicos.

4 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo, por meio de ensaios físico-químicos caracterização fitoquímica qualitativa e quantitativa, e impressão digital por CLAE-DAD, estabelecer especificações, inexistentes na literatura para a Cavalinha (*Equisetum giganteum*), fixando intervalos quantitativos a serem utilizados no controle de qualidade como valores de referências, proporcionando a padronização das matérias-primas para assegurar a conformidade dos produtos fitoterápicos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Efetuar análises físico-químicas, descritas na farmacopéia para outras plantas, para a determinação de valores de referência com intervalos quantitativos, a fim de serem utilizados no controle de qualidade da droga vegetal das partes aéreas da *Equisetum giganteum*;

Caracterização química da droga vegetal a partir da:

- Caracterização fitoquímica;
- Quantificação do teor de polifenóis totais e dos flavonóides totais;
- Desenvolvimento de método analítico para separação dos constituintes químicos dos extratos brutos da droga vegetal, utilizando o perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD para análise de impressão digital, buscando marcadores químicos.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica Shimadzu AX-200;
- Ultra-som Thornton;
- Rotavapor Fisatom;
- Centrífuga "speed vacuum" Joann/Thermo RC 1022;
- Liofilizador Edwards modulyo;
- Cromatografia de fase Líquida analítica Waters Alliance e2695;
- Cromatografia de fase Líquida preparativa Shimadzu;
- Espectrofotômetro Shimadzu E225-D;
- Espectrômetro de massas ultratOF_Q-ESI-TOF Bruker Daltonics.
- Estufa retilínea FANEM;
- Mufla EDG 3000

5.1.2 Solventes e Reagentes

Solventes: Hexano (grau p.a.- Vetec), Acetato de Etila (grau p.a. - Biotec), Diclorometano (grau p.a. - F. Maia), Acetona (grau p.a. - Nuclear), Metanol (grau p.a. - Vetec), Metanol (grau HPLC -J. T. Baker), Etanol (grau p.a. - Biotec), Acetonitrila (grau HPLC - Burdick & Jackson), Ácido Fórmico (grau p.a. - Synth), Água Destilada, Água ultrapura Milli-Q®.

Reagentes: Ácido Clorídrico (grau p.a. - Biotec), Ácido acético (grau p.a. - Synth), Cloreto de Alumínio (Biotec), Carbonato de cálcio (Merck), Hidróxido de Potássio (Merck), Cloreto Férrico (Synth), Fosfomolibdotungstíco, Reativo de Folin-Ciocalteau (Synth), Pirrogalol, Clorofórmio (Synth), Magnésio Metálico (Biotec), Gelatina, Acetato de Chumbo (Nuclear), Éter Etilico (Nuclear), Hidróxido de Amônio (Synth), Hidróxido de Sódio (Merck), Ácido Sulfúrico (F. Maia), Reagente de Dragendoff, Reagente de Valser-Mayer, Reagente de Bertrand.

5.2 MATERIAL VEGETAL

O material foi coletado em abril de 2009 na cidade de Londrina - PR. A planta foi identificada pela Prof^a. Dra. Ana Odete da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a exsicata com o código FUEL-46180 está depositada no Herbário da UEL.

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante a 45°C por 7 dias consecutivos. Após a secagem, a parte aérea da planta foi separada e então, submetida à cominuição, com o auxílio de um liquidificador. Em seguida a droga vegetal seca e moída foi acondicionada em Freezer em recipiente fechado até o início das análises.

5.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

5.3.1 Determinação do Teor de Umidade por Estufa

Amostras de 2,0000 g de droga vegetal secas e moídas foram pesadas, acondicionadas em pesa-filtros tarados e colocados em estufa, por 2 horas, a temperatura de 105°C. Após resfriamento em dessecador, provido de sílica, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais de 30 minutos. Este procedimento foi repetido até as amostras apresentarem peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, conforme Equação 1, pela média de cinco determinações (Farmacopéia Brasileira, 1997).

$$U(\%) = \frac{Pr_{es} * 100}{Pp_{fcheio} - Pp_{fvazio}} \quad (1)$$

Onde:

U = teor de umidade;

P res = peso residual;

P pfcheio = peso do pesa-filtro com a amostra;

P pfvazio = peso do pesa-filtro sem a amostra.

5.3.2 Determinação do Teor de Umidade por Balança de Infravermelho

Amostras de 1,0000 g da droga vegetal moída foram pesadas, em placas de Petri previamente taradas na balança de infravermelho. Após a secagem do material, colocou-se a balança em modo de dessecação por 20 minutos à temperatura de 110°C. Ao final deste procedimento verificou-se o peso final da amostra. O teor da umidade foi calculado pela Equação 1. O estudo foi feito em triplicatas.

5.3.3 Determinação do Teor de Cinzas Totais

Amostras de 3,000 g de droga vegetal seca e moída foram pesadas em balança analítica em cadinhos calcinados e tarados. As amostras foram pré-incineradas em bico de Bunsen até desaparecimento total da fumaça. Em seguida, foram colocadas na mufla a temperatura de 450°C e calcinadas até peso constante. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador com sílica e devidamente pesados. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, utilizando a Equação 2 através da média de cinco determinações (Farmacopéia Brasileira, 2000).

$$C_{TOT}(\%) = \frac{P_{res} * 100}{P_{cadcheio} - P_{cadvaZi0}} \quad (2)$$

Onde:

C_{TOT} = teor de cinzas totais;

P_{res} = peso residual;

$P_{cadcheio}$ = peso do cadinho com a amostra incinerada;

$P_{cadvaZi0}$ = peso do cadinho sem a amostra.

5.3.4 Determinação de Cinzas Insolúveis

No cadinho contendo as cinzas totais foram adicionados 25 mL de ácido clorídrico 10%(v/v), este foi coberto com um vidro de relógio e levado a fervura suavemente durante 5 minutos. O vidro de relógio foi lavado com água quente, sendo esta água de lavagem adicionada no cadinho. A matéria insolúvel foi recolhida em papel de filtro, sem a presença de cinzas, e lavada com água quente até o filtrado permanecer neutro. O papel de filtro, contendo a matéria insolúvel, foi transferido ao cadinho inicial, e inflamado a 800°C até peso constante. O resíduo foi resfriado em um dessecador por 30 minutos, depois pesado rapidamente. O teor de cinzas insolúveis em ácidos foi calculado conforme Equação 3 pela média de cinco determinações (WHO, 1998).

$$C_{insol} = \frac{P_{cadcheio} - P_{cadvazio} * 100}{P_{res}} \quad (3)$$

onde:

C_{insoi} = teor de cinzas insolúveis em ácido (%);

P_{res} = peso residual;

$P_{cadcheio}$ = peso do cadinho com amostra incinerada (g);

$P_{cadvazio}$ = peso do cadinho sem a amostra (g).

5.3.5 Determinação de Teor de Substâncias Extraíveis

Amostras de 2,0000 g de droga vegetal moída foram pesadas e transferidas em três cartuchos do extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco. Foram adicionados nos três balões do extrator, 200 mg de hidróxido de sódio. Nos diferentes extratores foram adicionados: água, álcool 50% e álcool 70% em quantidade suficiente para cobrir a planta. O tempo de extração foi de 5 horas. Após o término da extração o cartucho com o resíduo foi seco em estufa a 105°C. O resíduo foi pesado e calculado como teor de substâncias extraíveis e o resultado foi

referido em percentual relacionado ao peso da droga vegetal. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações (Farmacopéia Brasileira, 2000).

5.4 ENSAIOS FITOQUÍMICOS QUALITATIVOS DA DROGA VEGETAL

5.4.1 Determinação de Flavonóides

Pesou-se 15,0 g da droga vegetal moída e seca e adicionou-se 150,0 mL de etanol a 75 % (v/v), colocou-se no turbulizador por 15 minutos e filtrou-se com o auxílio de um algodão. Do extrato filtrado, 2,0 mL foram transferidos para um tubo de ensaio, adicionou-se cerca de 200 mg de magnésio em pó e cuidadosamente verteu-se no tubo de ensaio, aproximadamente 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado. Teste positivo para aparecimento de coloração róseo-avermelhada (COSTA, 2001).

5.4.2 Determinação de Cumarina

Aqueceu-se em chapa quente, até a sublimação, o pó da droga vegetal em uma câmara de microsublimação. O sublimado obtido foi dissolvido em metanol e transferido para um tubo de ensaio, em seguida adicionou uma solução alcoólica de KOH a 10%(v/v). A solução foi colocada em exposição a radiações ultravioletas para obtenção dos resultados. Resultado é considerado positivo quando a solução apresentar fluorescência de verde a amarelado (COSTA, 2001).

5.4.3 Determinação de Taninos

Pesou-se 15,0 g da droga vegetal moída e seca e adicionou-se 150,0 mL de etanol a 75 %(v/v), colocou-se no turbulizador por 15 minutos e filtrou-se com o auxílio de um algodão. O extrato foi distribuído em quatro tubos de ensaio identificados com numeração de 1 a 4, sendo que no Tubo 1 adicionou-se 2,0 mL do extrato, duas gotas de ácido clorídrico diluído e lentamente 6 gotas de gelatina a 2,5%(v/v), o resultado é considerado positivo quando a solução formar precipitado; no Tubo 2 adicionou-se 2,0 mL do extrato e 4 gotas da solução de FeCl_3 a 1% (m/v)

em metanol, o resultado é positivo quando a solução apresentar: Coloração azul, para presença de taninos hidrolisáveis ou gálicos e Coloração verde, para presença de taninos condensados ou catéquico; no Tubo 3 adicionou-se 5,0 mL do extrato, 10,0 mL da solução de ácido acético a 10%(v/v) e 5,0 mL da solução de acetato de chumbo a 10%(m/v), o resultado é considerado positivo para taninos hidrolisáveis ou gálico, quando a solução apresentar precipitado esbranquiçado; enquanto, o tubo 4 continha apenas 5,0 mL do extrato, para controle (GLASL, 1983).

5.4.4 Determinação de Antraquinonas

Pesou-se 2,0000 g da droga vegetal seca em pó e colocou-se em um tubo de ensaio. Adicionou-se éter etílico em quantidade suficiente que cobrisse o pó (4-8 mL). Agitou-se por 2 minutos e filtrou-se com o auxílio de algodão para outro tubo de ensaio. Adicionou-se ao filtrado 1,0 mL da solução de KOH a 10%(m/v). O resultado é considerado positivo quando a solução apresentar coloração de rósea a vermelho (COSTA, 2001).

5.4.5 Determinação de Saponinas

Para o teste qualitativo de espuma pesou-se 15,0 g da droga vegetal moída e seca e adicionou-se 150,0 mL de etanol a 75 %(v/v), colocou-se no turbulizador por 15 minutos e filtrou-se com o auxílio de um algodão. Transferiu-se 5,0 mL do extrato para um tubo de ensaio, e o mesmo foi agitado energeticamente por 30 segundos. Deixou a solução em repouso por 15 minutos e observou-se a presença da espuma. O resultado é considerado positivo quando se observar a espuma persistente com pelo menos 1 cm de altura (COSTA, 2001).

5.4.6 Determinação de Alcalóides

Para o teste qualitativo de alcalóides, ferveu-se em um béquer por cerca de 3 minutos, 5,0000 g da droga vegetal moída com 30 mL de HCl 2 N e filtrou-se com o auxílio de um algodão. O extrato foi distribuído em quatro tubos de ensaio identificados com numeração de 1 a 4, sendo que no Tubo 1 continha apenas 5,0 mL do extrato para controle; no Tubo 2 adicionou-se 2,0 mL do extrato e 3 gotas

do reagente de Dragendorff (vide reagente no Anexo A); no Tubo 3 adicionou-se 2,0 mL do extrato e 3 gotas do reagente de Valser-Mayer (vide reagente no Anexo A); no tubo 4 adicionou-se 2,0 mL do extrato e 3 gotas do reagente Bertrand (vide reagente no Anexo A). Os resultados são positivos quando ocorrer à turvação ou formação de precipitado para qualquer dos reagentes utilizados (COSTA, 2001).

5.4.7 Determinação de Fenólicos Simples

Preparou-se a câmara de microsублиmação sobre uma chapa quente. Colocou-se a droga vegetal em pó na argola de vidro, cobriu-se com a lâmina e observou-se a formação de sublimado. Esta primeira lâmina superior, por conter muita água, foi substituída por outra lâmina. Esperou-se a formação de condensado, na lâmina superior, de coloração amarelada e adicionou-se nesta lâmina contendo o sublimado cerca de 4 gotas de AgNO_3 amoniacal. A reação é positiva quando ocorrer à formação de precipitado negro (COSTA, 2001).

5.5 ENSAIOS FITOQUÍMICOS QUANTITATIVOS DA DROGA VEGETAL

5.5.1 Determinação de Polifenóis Totais

Amostras de 0,750 g da droga vegetal moída foram exatamente pesadas e transferidas para erlenmeyer de 250 mL em 5 replicatas ($n = 5$), adicionou-se 150 mL de água destilada a todas as amostras e em seguida aqueceu em banho maria por 30 minutos a temperatura de 60°C . Resfriou-se e transferiu-se as amostras qualitativamente com todo o conteúdo da droga vegetal para um balão volumétrico de 250,0 mL completando-se o volume com água destilada. Essa solução foi chamada de Solução-Mãe - SM. Deixou-se decantar, e o sobrenadante foi filtrado, desprezando os primeiros 50 mL.

Diluiu-se 5,0 mL do filtrado, com água destilada, em balão volumétrico de 25,0 mL. Transferiu-se volumetricamente 2,0 mL da solução diluída, 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água destilada em balão volumétrico de 25,0 mL, completou-se o volume com solução de carbonato de sódio a 290 g L^{-1} . Determinou-se a absorbância em 760 nm (A_{11}) após 30 minutos, utilizando-se água destilada como líquido de compensação.

Solução Padrão: Dissolveu com água destilada 5,0 mg de pirogalol em balão volumétrico de 10,0 mL. Transferiu volumetricamente 5,0 mL da solução para balão volumétrico de 100,0 mL e completou o volume com água destilada. Em seguida transferiu 2,0 mL desta solução, 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água destilada para balão volumétrico de 25,0 mL e completou o volume com solução de carbonato de sódio a 290 g L⁻¹. Após 30 minutos, determinou a absorbância em 760 nm (A₂), utilizando água como líquido de compensação.

As avaliações foram realizadas em quintuplicatas e o teor dos polifenóis totais foi calculado em porcentagem, expressos em pirogalol, utilizando a Equação 4 (GLASL, 1983):

$$TT = \frac{62,5 \cdot A_1 \cdot m_2}{A_2 \cdot m_1} \quad (4)$$

onde:

A₁ = absorbância da solução amostra para polifenóis totais;

A₂ = absorbância da solução padrão;

m₁ = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água;

m₂ = massa de pirogalol, em gramas.

5.5.2 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, colocou-se 0,4000 g da droga vegetal moída, acrescentou-se 1,0 mL de solução de urotropina a 0,5%(m/v), 20,0 mL de acetona e 2,0 mL de ácido clorídrico, aqueceu-se sobre a manta de aquecimento mantendo sob refluxo por 30 minutos. Após o resfriamento da solução, esta, com auxílio de funil e algodão foi filtrada para um balão volumétrico de 100,0 mL. Retornou-se o resíduo insolúvel e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, e adicionou-se 20,0 mL de acetona. Aqueceu-se a ebulição sob refluxo por 10 minutos e após resfriamento da solução, esta foi filtrada para o mesmo balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com acetona. Em funil de separação, foi adicionado 20,0 mL desta solução acetônica, 20,0 mL de água

destilada e extraída com 15,0 mL de acetato de etila, este procedimento foi repetido por três vezes com porções de 10,0 mL.

As frações de acetato de etila foram reunidas em balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com acetato de etila (Solução-mãe-SM).

Solução branco: transferiu 10,0 mL da solução-mãe para balão volumétrico de 25,0 mL, e completou o volume com solução metanólica de ácido acético.

Solução amostra: adicionou-se em um balão volumétrico de 25,0 mL, 1,0 mL do reagente cloreto de alumínio (vide Anexo A) e 10,0 mL de solução-mãe, completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético (vide Anexo A).

Após trinta minutos de reação, mediu-se a absorvância da solução amostra em 425 nm, utilizando a solução branco, para ajuste do zero.

As análises foram realizadas em triplicatas e o cálculo do teor baseou-se na absorbância específica da quercetina, $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 500$, segundo a Equação 5 (DEUTSCHES, 1994).

$$Q = \frac{Abs.62500}{500.e.(100 - t)} \quad (5)$$

onde:

Abs = absorbância medida;

e = massa da droga em g;

t = perda por dessecação (% , m/m).

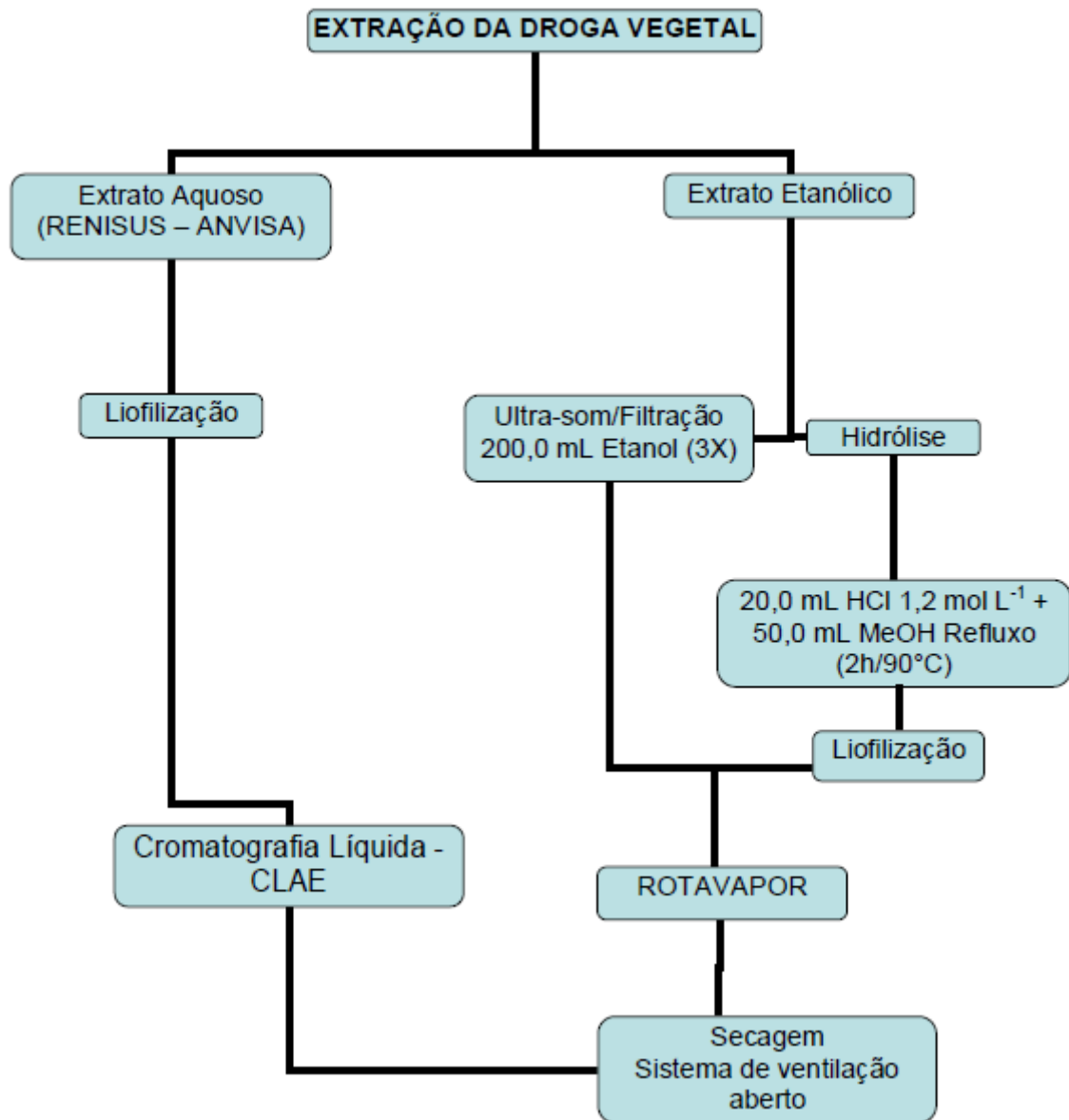
O resultado foi fornecido em percentual (m/m) de flavonóides calculados como quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$).

5.6 DETERMINAÇÃO DA IMPRESSÃO DIGITAL PELO PERFIL QUÍMICO DA DROGA VEGETAL

Os extratos etanólico e aquoso foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - DAD, para a avaliação do perfil químico da droga vegetal

das partes aéreas da *Equisetum giganteum*. A Figura 5 apresenta um organograma da obtenção dos extratos analisados.

Figura 5 - Organograma das extrações analisadas por cromatografia de fase líquida com arranjo de diodos.



5.6.1 Preparo do Extrato Aquoso

O preparo do extrato aquoso foi empregado conforme RENISUS (BRASIL, 2010) para fitoterápicos. Amostras de 3,0000 g de droga vegetal secas e moídas, foram pesadas e colocadas em infusão, com 150,0 mL de água, durante 15 minutos. Em seguida o extrato foi congelado e liofilizado.

5.6.2 Preparo do Extrato Etanólico

Para a extração da droga vegetal, amostra de 40,00 g da droga vegetal seca e moída, foi pesada em balança analítica e transferida para um erlenmeyer de 1 litro, em seguida adicionou-se 200,0 mL de etanol e sonicou-se à solução durante 15 minutos com o auxílio de um ultra-som. O extrato foi filtrado, utilizando papel de filtro pregueado faixa preta. Este procedimento foi executado em três repetições, totalizando 600,0 mL de extrato etanólico. O mesmo foi concentrado utilizando um rotavapor, e foi submetido a um sistema de ventilação aberto até sua secagem.

5.6.3 Hidrólise do Extrato Etanólico

Para a hidrólise ácida dos compostos presentes no extrato etanólico da droga vegetal, pesou-se 0,2036 g do extrato etanólico seco (5.6.2). Esse extrato foi transferido para um balão de 250,0 mL lavado em cinco porções de 10,0 mL de metanol puro, em seguida acrescentou-se 20,0 mL de solução de ácido clorídrico 1,2 mol L⁻¹ e esta solução foi sonicada durante 15 minutos. Colocou-se o balão contendo a solução em refluxo com banho de silicone a 90°C e agitação magnética durante duas horas.

Depois da reação de hidrólise, a solução foi concentrada utilizando um rotavapor, até um volume de aproximadamente 20,0 mL. Em seguida a solução restante foi congelada em nitrogênio e liofilizada. Os extratos secos foram armazenados em freezer até as análises químicas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE-DAD.

5.6.4 Condições Analíticas para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE-DAD

Para análise do perfil cromatográfico dos compostos presente nas soluções extrativas, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O equipamento utilizado foi um Alliance e2695 módulo de separação da Waters (Milford, MA, EUA) com detector arranjo de diodos (DAD). As análises foram realizadas no Laboratório DIA (Desenvolvimento, Instrumentação e Automação analítica) o equipamento consistiu de:

- Sistema de bomba quaternária com desgaseificador incorporado, utilizada na forma de gradiente com fase móvel utilizada - Metanol (J. T. Baker grau HPLC) no canal A, água ultrapura Milli-Q® acidificada a 2%(v/v) com ácido fórmico (grau p.a. - Synth) (pH 2,0) no canal C, e Acetonitrila (Burdick & Jackson grau HPLC) no canal D;
- Um injetor automático, de volume de injeção programado para 10,0 ul_ para introdução da amostra. O amostrador manteve as amostras em temperatura controlada de 28°C;
- Um forno à temperatura constante de 28°C contendo uma coluna C18 X-terra® (Waters, Milford, MA, EUA de 25 mm x 0,25 mm e 0,25 um de espessura do filme;
- Detector de arranjo de diodos, 2998 Waters;
- A aquisição e o tratamento dos dados foram feitas em um microcomputador com o *software* EMPOWER 2.0.

O gradiente linear empregou variações de vazão e fase móvel como apresenta a Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente linear da metodologia desenvolvida por Cromatografia de Fase Líquida.

Tempo (minutos)	Vazão (mL min. ⁻¹)	Canal A Metanol(%)	Canal C Água acidificada (%)	Canal D Acetonitrila(%)
Início	0,5	1,9	96,1	2,0
8,0	0,6	6,0	85,0	9,0
12,0	0,5	9,0	78,0	13,0
14,0	0,40	8,0	80,0	12,0
17,0	0,4	4,0	80,0	16,0
20,0	0,4	5,0	82,0	13,0
21,0	0,5	5,0	80,0	15,0
25,0	0,5	5,0	82,0	13,0
29,0	0,5	5,0	60,0	35,0
30,0	0,5	--	65,0	35,0
32,0	0,4	--	75,8	24,2
35,0	0,4	--	80,0	20,0
40,0	0,5	1,9	96,1	2,0

No início da corrida cromatográfica a vazão foi de 0,50 mL min⁻¹, com composição da fase móvel de 1,9% de A, 96,1 % de C e 2% de D até 8,00 min, alterando a vazão para 0,60 mL min⁻¹ com 6,0% A, 85,0 % C e 9% D. Aos 12,00 min a vazão foi de 0,50 mL min⁻¹ com 9,0% A, 78,0 % C e 13% D. Em 14 min a vazão foi de 0,40 mL min⁻¹ com 8,0% A, 80,0 % C e 12 % D mantendo até 16,00 min. Em 17,00 min, a vazão foi mantida em 0,40 mL min⁻¹ porém, com 4,0% A, 80,0 % C e 16% D e em 20 min com 5,0% A, 82,0 % C e 13% D. Em 21,00 min a vazão foi alterada para 0,50 mL min⁻¹ variando a composição para 5,0% A, 80,0 % C e 15% D ; em 25,00 min para 5,0% A, 82,0 % C e 13% D; em 29,00 min para 5,0% A, 60,0 % C e 35,0% D; em 30,00 min para 65,0 % C e 35,0% D. Em 32,00 min a vazão foi reduzida para 0,40 mL min⁻¹ com 75,8 % C e 24,2% D; em 35,00 min para 80,0% C, 20,0% D. Em 40,00 min a vazão voltou a 0,50 mL min⁻¹ com 1,9% A, 96,1% C e 2,0% D até 45 minutos. A análise foi feita com varredura do comprimento de onda de 210 nm a 400 nm, onde observou-se uma melhor resposta para os extratos analisados no comprimento de onda de 272 nm.

Para análise de todos os extratos pesou-se 0,0400 g de extratos secos, acrescentou-se 4,0 mL da solução de água acidificada 2%: Acetonitrila (1:1,

v/v), sonicou-se durante 10 minutos. O objetivo foi à reconstituição do extrato com o mínimo de eluente, suficiente apenas para a solubilização das amostras. Essas amostras foram filtradas em membrana 0,45 um de nylon. No método desenvolvido a corrida cromatográfica foi de 45 minutos, tempo suficiente para ocorrer à separação de todos os constituintes químicos presentes em qualquer extrato analisado.

5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de radicais livres de acordo com Brand-Williams et al. (1995) com adaptações.

A porcentagem de absorbância que permanece após 25 minutos de reação com o radical DPPH foi o parâmetro selecionado para a medida da atividade antioxidante. Para a quantificação da atividade antioxidante, uma curva de calibração foi previamente levantada, empregando dissoluções metanólicas de Trolox por litro de amostra (mmols Trolox L⁻¹) de acordo com a Equação (6), baseada no (TEAC do inglês 'Trolox Equivalent Antioxidant Activity').

$$TEAC = \frac{(Abs(d) - a)}{B} \quad (6)$$

onde:

Abs(d) = é a % de absorbância do DPPH que permanece depois de 25 minutos de reação com a amostra (sempre deverá estar entre 20 e 80%);

a = é o coeficiente linear da curva de calibração do Trolox;

B = é a inclinação da curva dada pelo coeficiente angular da curva de calibração do Trolox; o resultado deverá ser corrigido em função do fator de diluição aplicado a amostra.

Foram pesadas 0,01 g de extrato etanólico e aquoso seco da *E. giganteum*. As amostras foram solubilizadas com 1,0 mL de metanol (Fmaia, Brasil). De cada amostra foram tomados 100 ul_ e adicionados 2,9 mL de dissolução metanólica do radical DPPH (6,0x10⁻⁵ mol L⁻¹) (Sigma, Saint Louis, EUA).

Após 25 minutos a porcentagem de diminuição da absorbância a 515 nm foi medida empregando-se espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japão) e cubetas de acrílico com caminho óptico de 45 mm (Plastibrand, Alemanha), e quantificada pela equação da curva analítica, obtida para a atividade antioxidante equivalente de Trolox, garantindo que estivessem dentro da faixa linear de trabalho estabelecida de 0,116; 0,223; 0,335, 0446 e 0,558 mmol L⁻¹.

6 RESULTADOS E DICUSSÃO

6.1 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Pelo fato da *Equisetum giganteum* apresentar poucos estudos científicos, e por não ter sido encontrado até o momento nenhum estudo relacionado com o que foi desenvolvido neste trabalho, acredita-se que os resultados obtidos no mesmo, gerem importantes informações para os parâmetros de referências para o controle de qualidade da droga vegetal.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios dos parâmetros físico-químicos.

Tabela 2 - Resultados dos ensaios físico-químicos da droga vegetal da *E. giganteum*

Ensaio	Método (no. de repetições)	Média (m/m) (%) ± dp*	CV** (%)	Valor de referência (%)	Referência
Teor de umidade	(FARMACOPEIA Brasileira, 1997) (n = 5)	10,91±1,60	14,63	8 - 14	Simões et al., 2001
	(Balança de Infravermelho) (n = 3)	11,38±0,23	2,01		
Cinzas	Totais (n = 5)	5,64±0,35	6,12	-	-
	Insolúveis (n = 5)	14,41±0,57	3,99	Até 10 para a <i>E. arvensis</i>	Emea, 2008
Teor extrativo	Água (n = 5)	16,79±1,84	10,97	-	-
	Alcool (50%) (n = 5)	24,10±1,29	5,36		
	Álcool (70%) (n = 5)	29,03±0,78	2,68		
	Álcool (100%) (n = 5)	12,60±0,49	3,95		

*dp = Desvio padrão

**CV = Coeficiente de variação

Para a determinação dos parâmetros de referência da perda por dessecação da droga vegetal foram empregadas duas técnicas gravimétricas, utilizando estufa descrita pela Farmacopéia Brasileira, 1997, realizadas em quintuplicata, e utilizando balança de Infravermelho, feitas em triplicata. Os resultados destes parâmetros obtidos pela diferença dos pesos inicial e final da droga vegetal estão apresentados na Tabela 1. Este parâmetro é importante por servir como referência para o correto armazenamento da droga vegetal. Segundo Simões (2001), o excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. O teor de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias variou entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas nas monografias. Esta faixa de umidade que mencionou Simões é independente da técnica utilizada. Embora, as duas técnicas empregadas neste trabalho apresentaram coeficientes de variação menores que os 15%, previstos pelo ICH, a técnica de infravermelho apresentou menor variação. Porém, independente da técnica, os resultados obtidos neste trabalho foram adequados, e indicam valores de referência, em relação ao processo de secagem e armazenamento da droga vegetal, adequados para a comercialização.

Para determinação do teor de cinzas totais (n=5) foi utilizado à técnica descrita na Farmacopéia Brasileira, 2000, e para a determinação das cinzas insolúveis foi utilizada a técnica descrita pela WHO, 1998 (n=5), que estão apresentados na Tabela 1. Estes dois ensaios são importantes para o controle de qualidade, uma vez que o objetivo é verificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes (SIMÕES, 2001). Estes resultados obtidos constituem referências de qualidade quanto à pureza da droga vegetal.

Para a análise do teor extrativo da droga vegetal (n=5) foram empregados quatro diferentes extratores que foram: água, álcool 50%(v/v), álcool 70%(v/v) e o álcool 100%, segundo a Farmacopéia Brasileira, 2000. Observando os resultados da Tabela 2 é possível notar que dos três extratores testados, o álcool 70% foi o que apresentou maior rendimento de extração.

6.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Como a *Equisetum giganteum* é uma planta com poucos estudos científicos, foi necessário, além dos testes físico-químicos, que fossem realizados testes de caracterização fitoquímica, para determinação dos grupos químicos presentes nesta espécie. Esta caracterização da *E. giganteum* foi feita por reações químicas qualitativas, a partir da droga vegetal seca com reagentes específicos para cada classe, mostrando ausência dos grupos: antraquinona, alcalóides e fenólicos simples e presença para os flavonóides, cumarinas, taninos, saponinas como está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios de caracterização fitoquímica da droga vegetal da *Equisetum giganteum*

Grupo Químico	Método	Avaliação
Flavonóides	Costa, 2001	Positivo
Cumarinas	Costa, 2001	Positivo
Taninos	Glasl, 1983	Positivo
Saponinas	Costa, 2001	Positivo
Antraquinona	Costa, 2001	Negativo
Alcalóides	Costa, 2001	Negativo
Fenólicos Simples	Costa, 2001	Negativo

Na literatura foram encontradas algumas substâncias ou grupos de substâncias de outras espécies para o gênero *Equisetum*. Para a *E. arvense* os grupos que estão presentes na droga vegetal são os flavonóides, alcalóides, ácidos orgânicos, saponinas, taninos e ainda apresenta ácido silícico e triglicerídeo (VAZ, JORGE, 2006). Já a *E. hyemale* apresenta em seu óleo essencial ácidos graxos na forma de ésteres, sendo que o principal constituinte isolado foi o palmitato de etila. Apresenta ainda campferol no seu extrato etanólico e nas partes aéreas da planta foram isolados glicosídeos de flavonóides (BOCARDI, 2008). Para a *E. myriochaetum* foram encontrados dois compostos o campferol-3-O-soforondeo e o campferol-3,7-di-O-p-glicosídeo (WIEDENFELD, CETTO, AMADOR, 2000). Na *E. debile* foi identificado à presença de flavonóides e megastigmanes

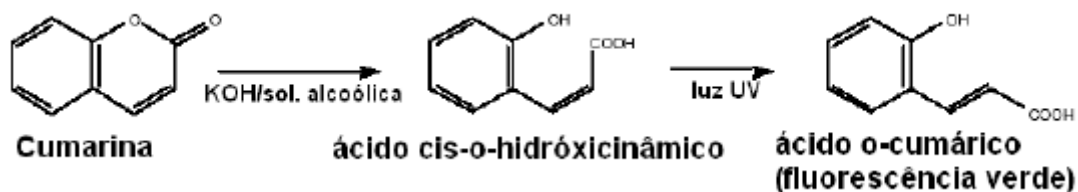
(KANCHANAPOOM; OTSUDA; RUCHIRAWAT, 2007). Na *E. palustre* foi identificado a presença nas partes aéreas da planta e em extrato n-butanólico, flavonóides diglicosilados como o campferol 3-O-1-β-d-glucopiranosil-3-O-1'-β-glucopiranosideo (YESILADA; GURBUZ 2010).

Foi possível confirmar experimentalmente a presença do grupo dos flavonóides na *E. giganteum*, concordando com o resultado experimental reportados pela literatura, onde todas as espécies de *Equisetum* anteriormente citadas, apresentam este grupo. Também foi possível confirmar experimentalmente a presença de taninos e saponinas na *E. giganteum*, concordando com o resultado da literatura, com presença desses grupos para a *E. arvenses*.

As cumarinas, que apresentam várias propriedades farmacológicas, sendo utilizada no tratamento do vitiligo (RADUNZ, 2004), em contato com meio alcalino transforma-se em ácido cis-o-hidróxicinâmico, que em contato com a luz UV origina seu isômero trans o ácido o-cumárico que é fluorescente, conforme mostrado na Figura 6.

A caracterização da cumarina foi positiva (item 5.4.2), o extrato metanólico apresentou fluorescência de verde a amarelado quando foi adicionado solução de hidróxido de potássio a 10%(v/v), podendo ser visualizada quando a solução foi exposta a radiações ultravioletas (lâmpada UV com X de 254 a 366 nm). Não foi encontrada descrita na literatura nenhuma espécie do gênero *Equisetum* que apresenta esta classe.

Figura 6 - Reação de fluorescência da cumarina



Fonte: Costa, 2001

Pelas reações qualitativas (item 5.4.3) apresentaram-se positivas para detecção dos taninos. Os taninos apresentam ação antidiarréica podendo ser

utilizado nos casos de desintéria (BARROS et al., 2007); atividade antisséptica, explicada pela ação em precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando um revestimento protetor (CAVALAZZI, 2006); e ainda atividade antimicrobiana (NUNES et al., 2003), vasoconstritora, antiedematosa e antiflogística (CAVALAZZI, 2006),

No teste de caracterização das saponinas descrito no item 5.4.5, a espuma formada pela agitação foi persistente, obtendo resultado positivo. Além da espécie *giganteum*, a literatura cita que a espécie *arvense* também apresenta saponina (VAZ; JORGE, 2006), como parte dos seus compostos químicos. Saponinas são glicosídeos com propriedade de formar espuma abundante em presença de água.

São tóxicas para peixes, crustáceos e insetos, mas não ao homem devido a sua baixa capacidade de absorção pelo estômago e intestino (BEVILÁQUA; SCHIEDECK; SCHWENGBER, 2007). Exercem atividade molusquicida, antiviral e antifúngica (SOARES et al., 2009). Conforme Bevilaqua, Schiedeck e Schwengber (2007), as saponinas são de ocorrência ampla em plantas medicinais e comestíveis, com atividades, fungicida e antibiótica, ou antiinflamatória e antiulcerosa.

Para caracterizar os flavonóides na *E. giganteum* inicialmente foi feito à identificação dos flavonóides (item 5.4.1) onde a reação mostrou-se positiva para este teste qualitativo, apresentando coloração de amarelo a vermelho. Existe uma crescente convicção de que alguns flavonóides são particularmente benéficos, atuando como antioxidantes e dando proteção contra doenças cardiovasculares e certas formas de câncer (DEWICK, 2002), apresentando ainda atividade antimicrobiana (VIEIRA, 2008). Contribuem para dar cores as flores e frutos. O amarelo dos flavonóides é das chalconas, o vermelho, azul e violeta das antocianidinas. Mesmo os materiais incolores, por exemplo, flavonas, absorvem fortemente no ultravioleta (DEWICK, 2002).

Após a realização da caracterização fitoquímica foram feito testes quantitativos para os polifenóis totais (item 5.5.1) e para os flavonóides totais (item 5.5.2). O primeiro teste quantitativo realizado foi o dos polifenóis totais, que constituem uma classe importante de metabólitos da planta, e podem estar relacionados com o potencial antioxidante da mesma (LIMA et al., 2009). Pelos valores de $0,96 \pm 0,07\%$ (m/V) com CV=7,40%, observa-se que a espécie estudada

apresenta polifenóis totais. Entre os polifenólicos estão os grupos dos flavonóides, taninos e antraquinonas.

A análise dos flavonóides totais apresentou resultado positivo com $0,68 \pm 0,07\%$ (m/V) e CV=10,89%. Além da *Equisetum giganteum*, conforme citado acima, a *E. arvense*, a *E. hyemale*, a *E.myriochaetum*, a *E.debile* e a *E. palustre* também apresentam a classe dos flavonóides, como parte dos seus constituintes químicos.

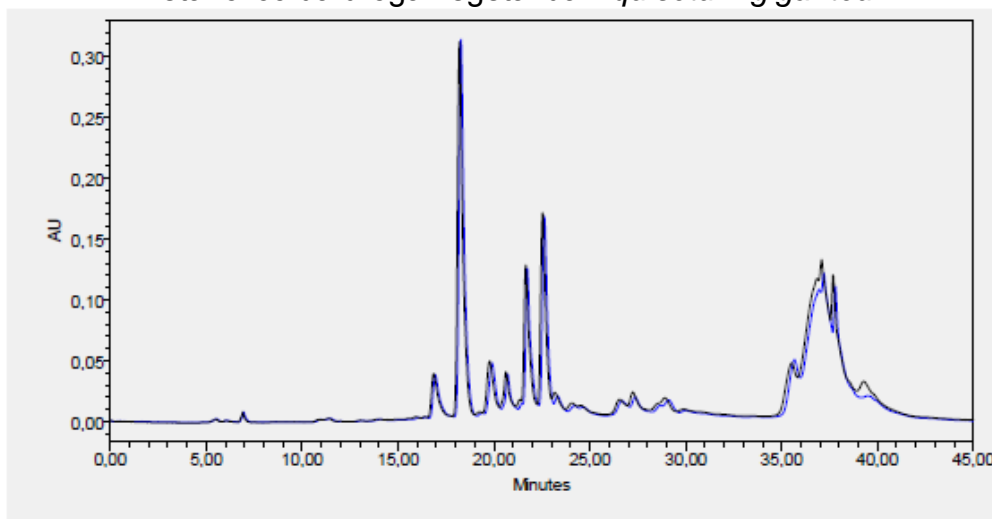
6.3 IMPRESSÃO DIGITAL COM PERFIL DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO OBTIDOS DA DROGA VEGETAL

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) vem sendo muito utilizada para auxiliar no controle de qualidade principalmente de drogas vegetais, pois, ela apresenta na maioria das vezes, agilidade, seletividade e reprodutibilidade quando a técnica de separação para determinados constituintes já está desenvolvida.

Para a análise do perfil químico da droga vegetal deste trabalho foi necessário desenvolver metodologia de separação que fosse capaz de eluir todos os constituintes químicos presentes nos extratos brutos.

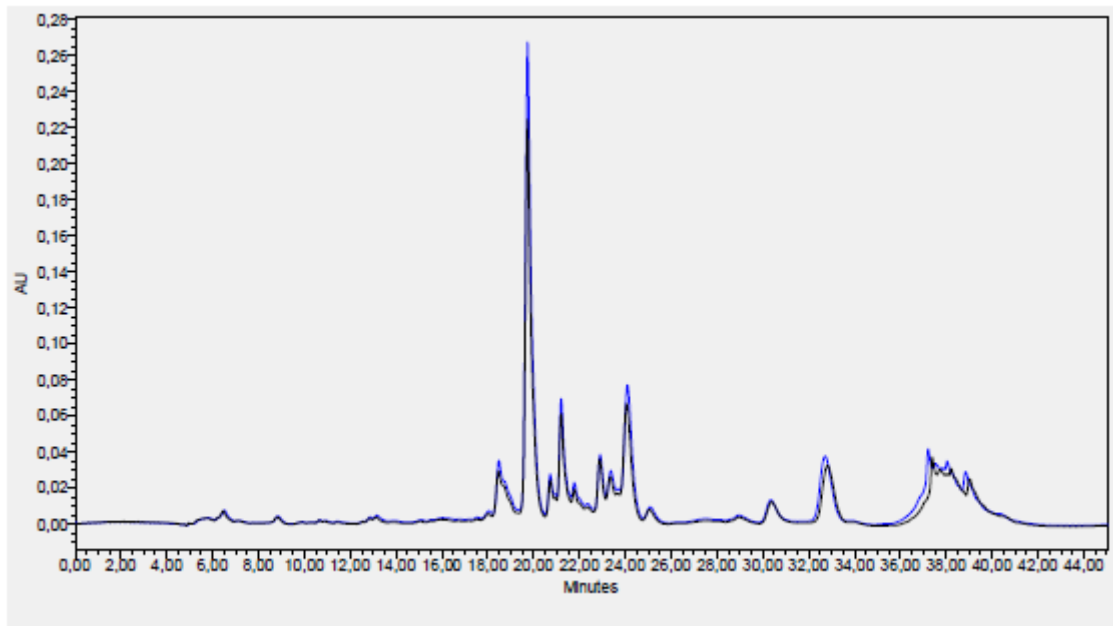
A Figura 7 representa a precisão intermediária mostrada em uma análise realizada em duplicata do extrato etanólico da droga vegetal preparado conforme seção 5.6.2.

Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos da duplicata do extrato etanólico da droga vegetal da *Equisetum giganteum*.



A Figura 8 apresenta a precisão intermediária mostrada em uma análise realizada em duplicata, do extrato aquoso preparado conforme indicação do RENISUS, resolução n° 10 da ANVISA (BRASIL, 2010) (seção 5.6.1).

Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos do extrato aquoso da *Equisetum giganteum*(n=2).



Portanto, a metodologia desenvolvida para a separação dos constituintes químicos, mesmo para extratos brutos, onde existe certa dificuldade de separação dos constituintes pelo grande número de compostos, mostrou-se adequada para o controle, percebendo-se a reprodutibilidade, quando empregadas sob as mesmas condições analíticas, mas em dias diferentes. O cromatógrafo em fase líquida utilizado para as análises das amostras por apresentar detector com arranjo de diodos, que permite a obtenção dos espectros de todos os picos separados durante as análises, facilita a discussão para os diferentes tipos de extratos.

A Figura 9 mostra a sobreposição dos cromatogramas do extrato aquoso e etanólico e a Tabela 3 representa os dados das áreas dos picos majoritários dos dois extratos.

Figura 9 - Sobreposição de cromatogramas dos extratos aquoso e etanólico da droga vegetal da *Equisetum giganteum*.

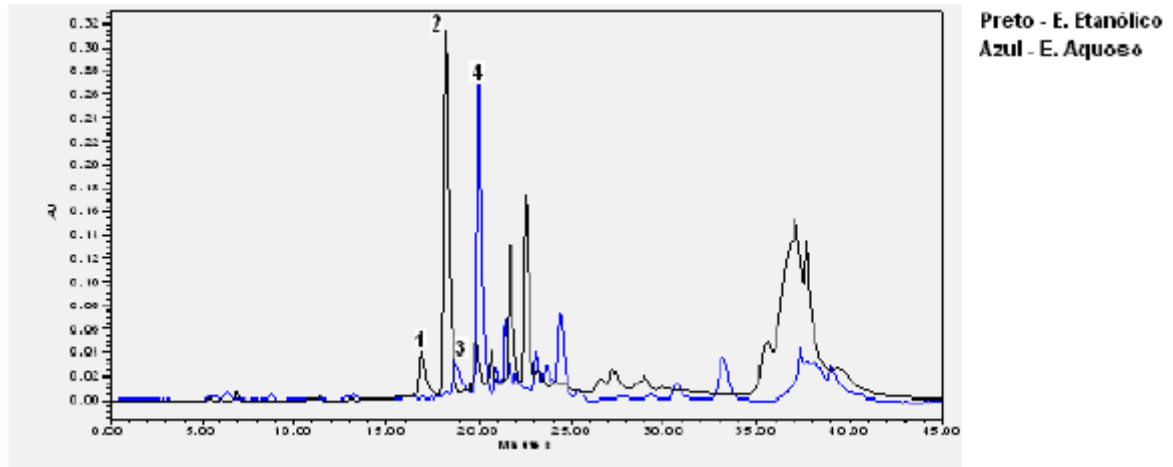


Tabela 4 - Dados dos picos majoritários obtidos a partir das análises cromatográficas dos extratos aquoso e etanólico das partes aéreas da droga vegetal da *E. giganteum* da Figura 9.

Picos	Tempo de retenção (min.)	Área (u.a.)	Áreas (%)	Extrato	Bandas de Absorbância máxima UV (nm)
1	16,88	841972	2,65	Etanólico	256,6; 356,6
2	18,21	5878501	18,53	Etanólico	266,1; 347,0
3	18,69	947189	5,47	Aquoso	255,4; 353,0
4	19,96	4674282	27,00	Aquoso	266,1; 348,2

O rendimento dos extratos etanólico da droga vegetal (5.6.2) e aquoso (5.6.1) foram de 5,10%(m/m) e 5,68%(m/m), respectivamente.

Analisando os cromatogramas de cada extrato isolado, bem como, da sua sobreposição (Figura 9), pode-se observar pelas características cromatográficas, que o perfil para o extrato aquoso e o extrato etanólico da droga vegetal total foram similares especialmente para os picos iniciais (1 e 2 do etanólico) parecendo ser os mesmos compostos, com deslocamentos nos tempos de retenção, podendo ser retardados por efeito da matriz para o aquoso (picos 3 e 4), e distintos para os posteriores, aplicando-se a metodologia desenvolvida.

Selecionando-se estes picos para efeito comparativo, percebe-se pela Tabela 3, que os picos 3 e 4, que pertencem ao cromatograma do extrato aquoso, apresentaram maiores áreas com 5,47% e 27,0%, respectivamente, quando comparado aos picos 1 e 2 do extrato etanólico, com áreas de 2,65% e 18,53%, respectivamente.

Visando confirmar se são os mesmos compostos, já que os picos parecem iguais, porém com tempos de retenção distintos, os espectros UV para o pico 1 do extrato etanólico de 16,88 minutos (Figura 10) e pico 3 do aquoso com 18,69 minutos (Figura 11) foram comparados. Observou-se 2 bandas, com espectros característicos de compostos do grupo dos flavonóis, com a 1ª banda de 240-285 nm e a 2ª banda de 352-385 nm. Concluí-se que são flavonóis, porém não são os mesmos compostos, pois a 1ª banda do pico 1, além do máximo em 256,6 nm apresenta ainda um ombro em 290 nm, que não aparece para o pico 2 que apresenta seu máximo em 255,4 nm. Também observa-se um deslocamento dos máximos para a 2ª banda de 356,6 e 353 nm, respectivamente.

Comparando-se os picos 2 (extrato etanólico) e 4 (extrato aquoso) estes apresentam menor variação no tempo de retenção e similaridade nos espectros UV, Figuras 12 e 13, respectivamente. A 1ª banda apresenta absorção máxima idêntica em 266,1 nm, já para a 2ª banda ocorre um pequeno deslocamento, com o máximo de absorção em 347,0 nm para o pico 2, enquanto a absorção máxima foi de 348,2 nm para o pico 4. Concluí-se, portanto, que devem ser mesma substância química, com bandas características do grupo das flavonas, com a 1ª banda entre 240-285 nm e a 2ª entre 304-350 nm.

Figura 10 - Espectro do pico número 1 com tempo de retenção de 16,88 minutos do extrato etanólico da *E. giganteum* (Figura 9).

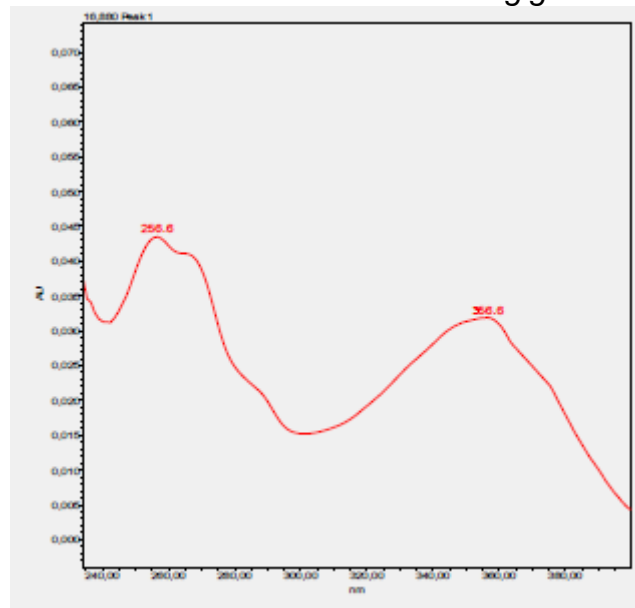


Figura 11 - Espectro do pico número 3 com tempo de retenção de 18,69 minutos da do extrato aquoso da *E. giganteum* (Figura 9).

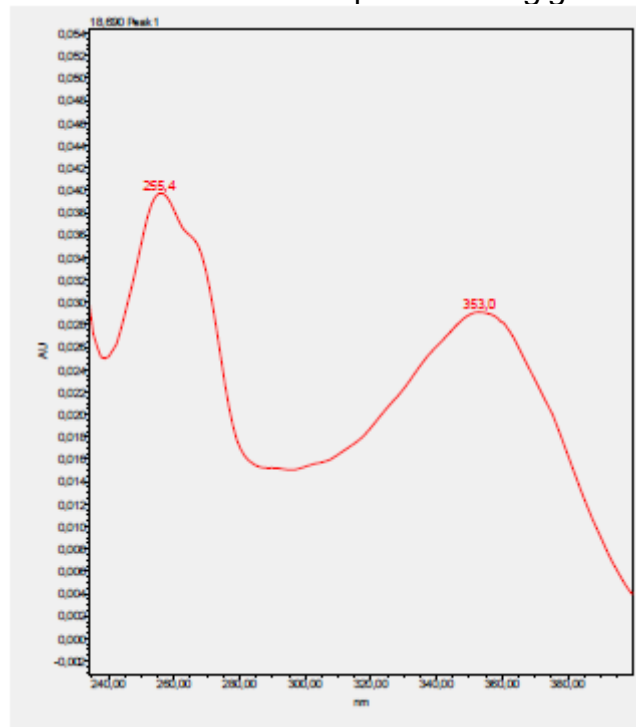


Figura 12 - Espectro do pico número 2 com tempo de retenção de 18,21 minutos do extrato etanólico da *E. giganteum* (Figura 9).

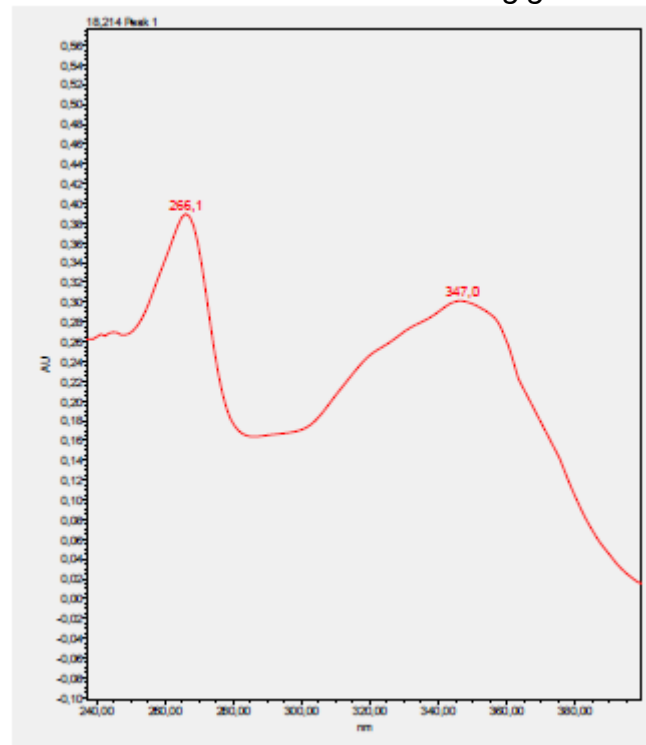
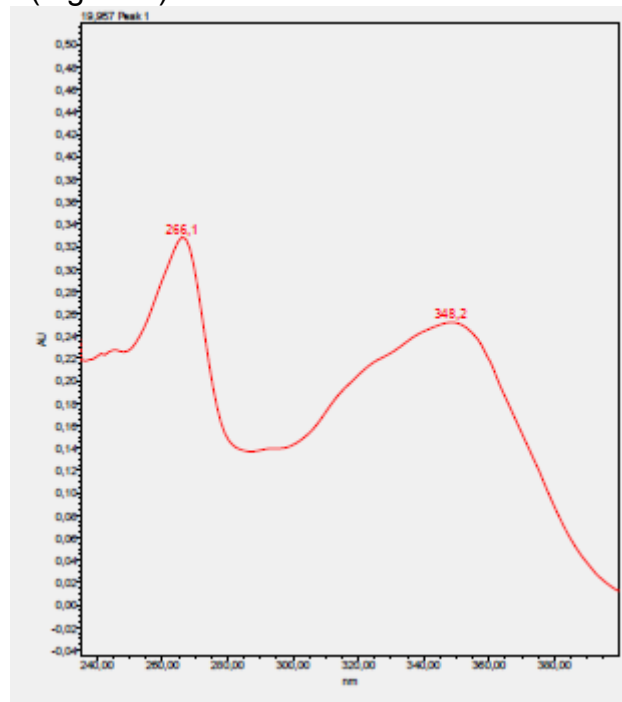


Figura 13 - Espectros do pico número 4 com tempo de retenção de 19,95 minutos do extrato aquoso da *E. giganteum* (Figura 9).



Para teste de estabilidade dos constituintes químicos extraídos no extrato etanólico bruto foi feito a hidrólise ácida do extrato etanólico.

A Figura 14 mostra a sobreposição do extrato etanólico da droga vegetal e da hidrólise ácida do extrato etanólico da droga vegetal, permitindo a visualização da variação dos constituintes químicos em relação ao tempo de retenção, área e perfil UV entre os picos. A Tabela 4 apresenta a área dos principais picos dos cromatogramas da Figura 15.

Figura 14 - Sobreposição de cromatogramas do extrato etanólico da droga vegetal e do extrato etanólico hidrolisado da *E. giganteum*.

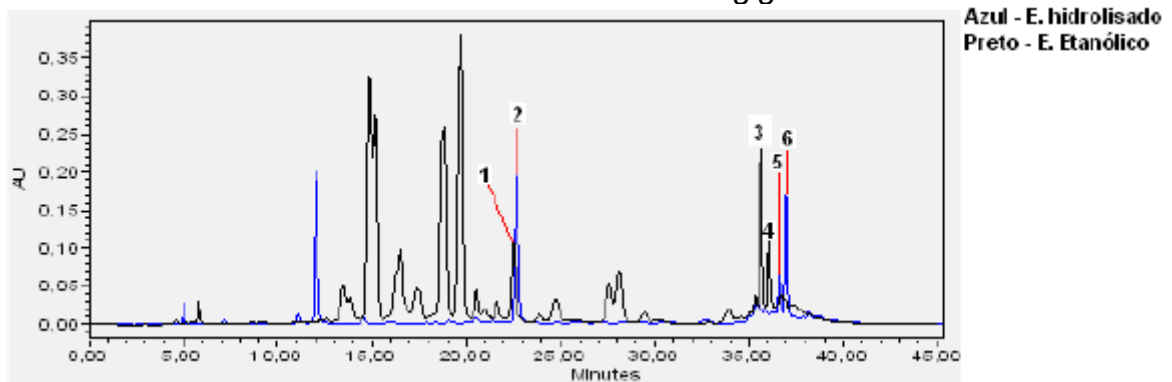


Tabela 5 - Dados dos picos majoritários obtidos a partir das análises cromatográficas dos extratos etanólico e extrato etanólico hidrolisado da droga vegetal da *E. giganteum* (Figura 14).

Picos	Tempo de retenção (min.)	Área (u.a.)	Áreas (%)	Extrato	Absorbância máxima UV (nm)
1	22,49	1655452	4,53	Etanólico	255,4; 375,5
2	22,67	2808323	42,16	Etanólico hidrolisado	282,7
3	35,66	2093924	5,73	Etanólico	275,5; 332,6; 382,7
4	36,06	1248273	3,42	Etanólico	266,1; 348,2
5	36,59	371656	5,22	Etanólico Hidrolisado	275,5; 332,6; 380,3
6	37,00	1270782	17,84	Etanólico Hidrolisado	266,1; 363,4

Observando a Figura 14 é possível notar a diferença cromatográfica, onde depois do extrato etanólico sofrer hidrólise ácida o número de picos foi reduzido consideravelmente. Uma hipótese é a de que os picos que desapareceram eram de compostos glicosilados, substâncias químicas com diferentes posições das ligações da glicose nos anéis aromáticos, cujas ligações foram quebradas na hidrólise ocorrendo uma diminuição destas substâncias.

Observando-se na Tabela 4 e no cromatograma da Figura 14, existe similaridade dos tempos de retenção 22,49 minutos do pico 1(etanólico) com 22,67 minutos do pico 2 (etanólico hirolisado). Porém, comparando-se os espectros UV, observa-se que são compostos completamente distintos, pois o 1° (pico 1) apresenta duas bandas com os máximos de absorção em 255,4 e 375,5 nm (Figura 15), enquanto o 2° (pico 2) (Figura 16), apresenta uma única banda em 282,7 nm.

Figura 15 - Espectro UV do pico número 1 com tempo de retenção de 22,49 minutos do extrato etanólico da *E. giganteum* (Figura 14).

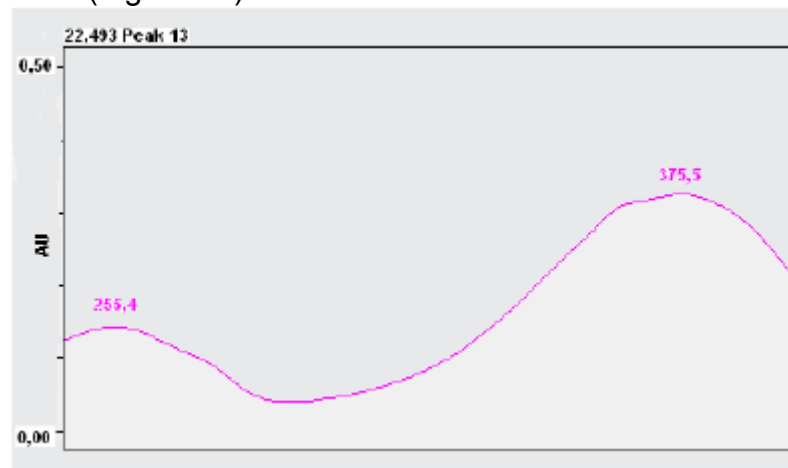
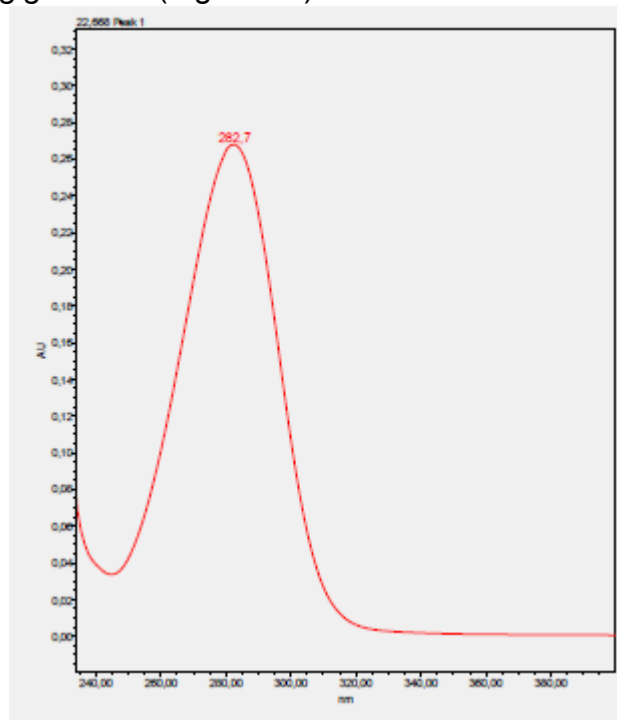


Figura 16 - Espectro UV do pico número 2 com tempo de retenção de 22,67 minutos do extrato etanólico hidrolisado da *E. giganteum* (Figura 14).



Embora com tempo de retenção um pouco distinto de 35,66 minutos para o pico 3 (etanólico) e de 36,59 minutos para o pico 5 (etanólico hidrolisado), a comparação dos espectros UV (Figura 17) e (Figura 18) demonstram um perfil muito similar com 3 máximos, antes (275,5; 332,6; 382,7 nm) e depois do extrato etanólico sofrer a hidrólise ácida (275,5; 332,6; 380,3 nm), o que poderia indicar potencial para ser utilizado como marcador químico de controle de qualidade da droga vegetal em relação a estabilidade.

Figura 17 - Espectro UV do pico número 3 com tempo de retenção de 35,66 minutos do extrato etanólico da *E. giganteum* (Figura 14).

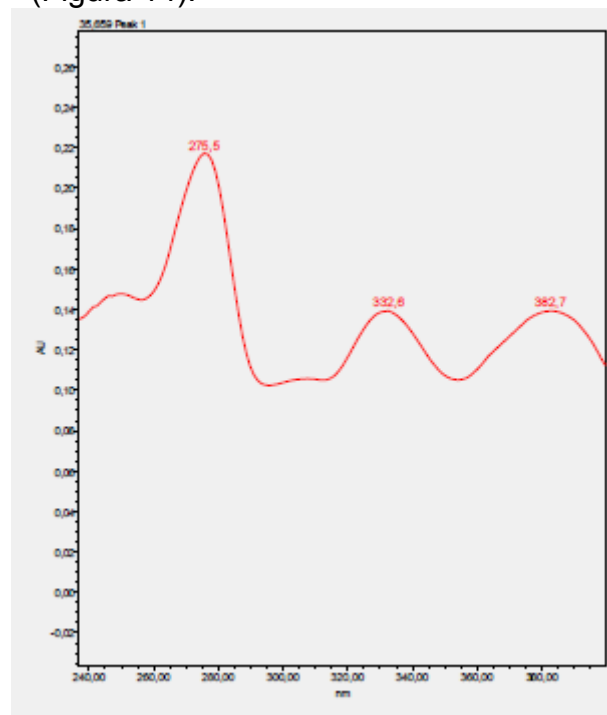
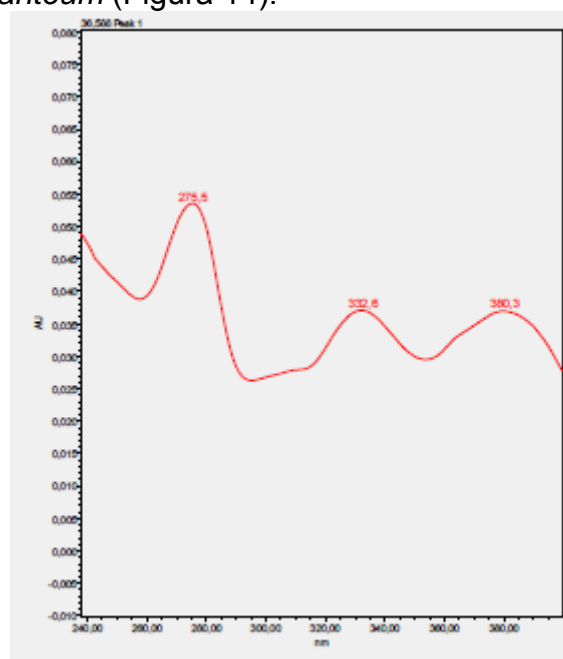


Figura 18 - Espectro UV do pico número 5 com tempo de retenção de 36,59 minutos do extrato etanólico hidrolisado da droga vegetal da *E. giganteum* (Figura 14).



Comparando-se os espectros dos picos 4 e 6 (Figura 19 e 20) estes possuem duas bandas de absorção. É possível visualizar na 1ª banda que ocorre variação de absorção do espectro dos dois picos, onde o pico 4 (extrato etanólico) apresenta característica do espectro do UV do grupo das flavonas, enquanto para o pico 6 (extrato etanólico hidrolisado) a característica do espectro UV é para o grupo dos flavonóis.

Figura 19 - Espectro UV do pico número 4 com tempo de retenção de 36,06 minutos do extrato etanólico da *E. giganteum* (Figura 14).

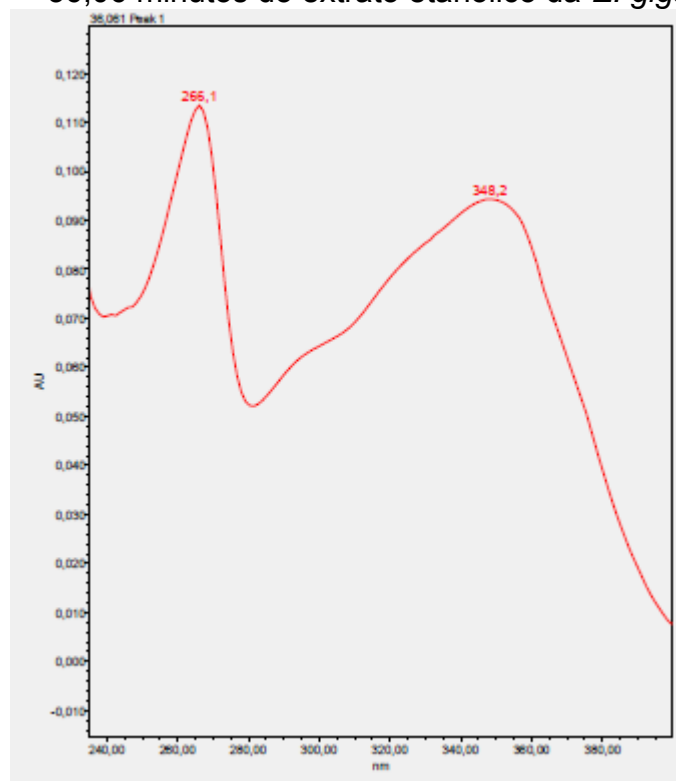
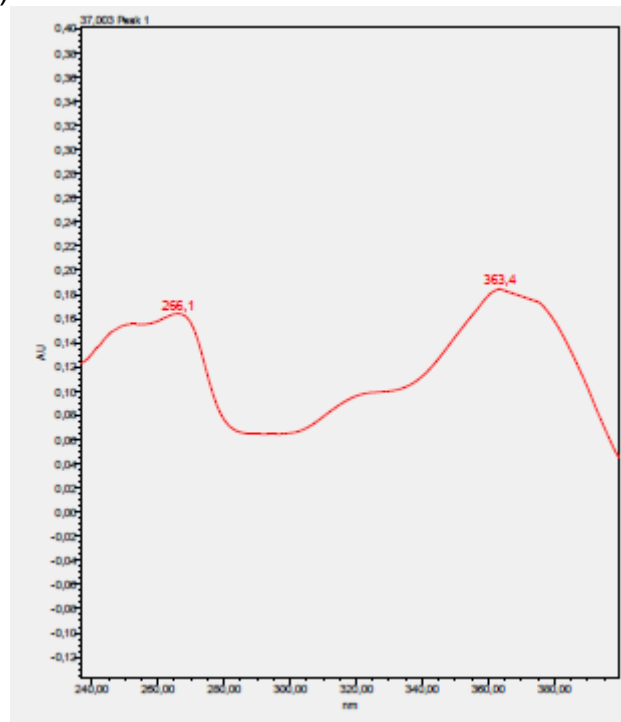


Figura 20- Espectro UV do pico número 6 do com tempo de retenção de 37,00 minutos do extrato etanólico hidrolisado da *E. giganteum* (Figura 14).



Como a metodologia de separação dos constituintes químicos já foi desenvolvida, estudos futuros de identificação dos constituintes químicos e o isolamento de um composto químico deverão ser feitos, além do controle físico-químico, caracterização fitoquímica, para que sirvam de marcador químico da droga vegetal, e permitam uma completa validação de metodologia.

6.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO OBTIDOS A PARTIR DA DROGA VEGETAL

A capacidade antioxidante, calculada a partir da regressão da curva de calibração apresentado Equação da reta $Abs = 0,4932 - 0,83871[Trolox(mmol L^{-1})]$, com coeficiente de correlação linear superior a 0,99, foi de 150 mmol L⁻¹ para o extrato etanólico e 179 mmol L⁻¹ para o extrato aquoso.

7 CONCLUSÕES

O controle físico-químico é muito utilizado para garantir a qualidade da droga vegetal, baseado nas farmacopéias, quando existe a monografia da planta. Como a planta estudada não apresentava monografia na farmacopeia, foi necessário o desenvolvimento de metodologia capaz de avaliar a qualidade da droga vegetal para utilização farmacêutica e alimentar.

Os métodos empregados para ensaios físico-químicos de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis e substâncias extraíveis, mostraram-se adequados, permitindo estabelecer valores de referência a serem adotados para o controle de qualidade em termos de pureza e armazenamento da droga vegetal da espécie *Equisetum giganteum*, considerando-se não terem sido encontrados dados desta espécie na literatura.

A caracterização fitoquímica, apresentou-se negativa para antraquinona, alcalóides e fenólicos simples, e positiva para os polifenóis totais, saponinas, flavonóides totais, e cumarinas, permitindo uma distinção da espécie de *Equisetum giganteum*, por ser a única que apresenta-se positiva para as cumarinas.

O método desenvolvido empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD) propiciou a criação de impressão digital pelo perfil químico do extrato aquoso e extrato etanólico, bem como, foi capaz de auxiliar no teste de estabilidade, empregando os espectros de ultravioleta que permitiram a visualização da permanência de apenas um composto químico, a não sofrer nenhum tipo de alteração, após o extrato etanólico ter sido exposto ao estresse ácido. O método ainda apresentou boa resolução entre os constituintes químicos presentes no extrato bruto da droga vegetal e boa repetitividade, podendo ser empregado em estudos futuros para validação e a quantificação de marcadores químicos.

A presença de polifenóis e flavonóides totais na droga vegetal, justifica as elevadas capacidades antioxidantes, encontradas para os extratos etanólico e aquoso.

REFERÊNCIAS

- BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S. S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 211-215, 2006.
- BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 5, p. 652-662, 2007.
- BEVILAQUA, G. A. P.; SCHIEDECK, G.; SCHWENGBER, J. E. Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Circular Técnica**, Pelotas, n. 61, 2007. Disponível em: <[http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circulares/Circular_61 .pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circulares/Circular_61.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2010.
- BIACHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.
- BOCARDI, J. M. B. **Etnofarmacologia das plantas medicinais de Céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr.** 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em química aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- BORGES, D. B. **Comparação de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle de qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal.** 2005. 161 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira.** Brasília: Ministério da Saúde, 2007
- _____. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de plantas medicinais da central de medicamentos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. **Resolução de diretoria colegiada nº 48, março de 2004.** Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- _____. **Resolução de diretoria colegiada nº 10, março de 2010.** Brasília Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1., 2004, Lisboa. **Anais...** Lisboa: INIFAP, 2004. p. 61-102.

CAMARGO, E. E. S. **Diagnóstico dos programas de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, visando subsidiar a distribuição no sistema único de saúde.** 2010. 223 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CAVALAZZI, M. L. **Plantas medicinais na atenção primária a saúde.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 1361-1371, 2003.

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia experimental.** 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3.

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, Kyoto, v. 78, n. 3, p. 1054-1059, 2007.

DEUTSCHES ARZEIBUCH. 10. ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 2. ed. New York: Wiley, 2002.

DUARTE-ALMEIDA J. M.; SANTOS R. J.; GENOVESE M. I.; LAJOLO F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em anápolis, Goiás.** 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e meio Ambiente) -Centro Universitário de Anápolis, Anápolis.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMEA. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS - HMPC. **Assessment report for the development of community monographs and for inclusion of herbal substance (s), preparation (s) or combinations thereof in the list.** London: [s.n], 2008.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Andrei, 1997. Parte 1-2

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. v. 2. fac. 2.

FERREIRA, V. B. N. **Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *equisetum arvense* e da *marsypianthes chamaedrys***. 2001. 95 p. Dissertação (Pós-graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FRANÇA, M. S. J. SUS amplia oferta de fitoterápicos na rede. Brasil Econômico, 10 março 2010. **Folha biodiversidade**, p. 5. Disponível em: <http://www.brasileconomico.com.br/public/uploads/epaper/BE_2010-03-10.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2010.

GLASL, H. Zur photometrie in der drogenstandardisierung - 3: gehaltsbestimmung von gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, Berlin, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

GUIMARÃES, E. C. B. T. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle químico da qualidade de fitoterápicos à base de extrato seco de alcachofra**. 2007. 87 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

HUSBY, C. **Galeria de Chad Husby**, 2008. Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/calamites/2264069124/in/set-72157623978192084/>>. Acesso em: 12 ago. 2010.

KANCHANAPOOM, T.; OTSUDA, H.; RUCHIRAWAT, S. Megastigmane glucosides from *equisetum debile* and *E. diffusum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 55, n. 8, p. 1277-1280, 2007.

LAN, K.; ZHANG, Y.; YANG, J.; XU, L. Simple quality assessment approach for herbal extracts using high performance liquid chromatography-uv based metabolomics platform. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1414-1418, 2010.

LEÃO, K. V. **Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais: embaúba, malva e ginseng brasileiro**. 2010. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Graduação em Química. Universidade Estadual de São Carlos, São Carlos.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 8, p. ini.-fin., 2008.

LIMA, I. M. P.; GERHARDT, A.; BARATO, T. B.; FREITAS, E. M.; MARCHI, M. I.; ETHUR, E. M. **Determinação de polifenóis totais e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas de *Myrcia palustris* (O. Berg) D. Legrand**. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 17, 2009, Rio Grande. Anais. Local: Rio Grande Editora da FURG, 2009. p. 1-1

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

MELO, J. G. de. **Controle de qualidade e prioridades de conservação de plantas medicinais comercializadas no Brasil**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) -Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

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

NI, L. J.; ZHANG, L. G.; HOU, J.; SHI, W. Z.; GUO, M. L. A strategy for the evaluating antipyretic efficacy of Chinese herbal medicines based on UV spectra fingerprints. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 124, p. 79-86, 2009.

NÓBREGA, G. A.; PRADO, J. Pteridófitas da vegetação nativa do jardim botânico municipal de Bauru, estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 7-55, 2008.

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

OLIVEIRA, M. A. C; ALBUQUERQUE, M. M.; XAVIER, H. S.; STRATTMANN, S. G. J.; QUEIROZ, A. T. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcalóides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 357-364, 2006.

QUIRÓS, A. R. B.; LAGE-YUSTY, M. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. **Food Research International**, Inglaterra, v. 42, p. 1018-1022, 2009.

RADÜNZ, L. L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de Guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. 2004. 100 p. Tese (Pós-graduação em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Comunicado Técnico. Embrapa: Fortaleza, Ceará. Julho, 2007.

SANTANA, M. B.; MANDARINO, M. G.; CARDOSO, J. R.; DICHI, I.; DICHI, J. B.; CAMARGO, A. I.; FABRIS, B. A.; RODRIGUES, R. J.; FATEL, E. S.; NIXDORF, S. L.; SIMÃO, A. C.; CECCHINI, R.; BARBOSA, D. S. Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasmatic antioxidant potential in dyslipidemic subjects. **Nutrition**, Nova York, v. 24, p. 562-568, 2008.

- SAPEI, L.; NOSK, R.; STRAUCH, P.; PARIS, O. Isolation of mesoporus biogenic silica the perennial plant *Equisetum giganteum*. **Chemistry Materials**, Whashington, v. 20, p. 20202025, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMASN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2001.
- SOARES, M. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; FIGUEIREDO, A. D. L.; PIMENTA, F. C.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Análise da atividade antimicrobiana das folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 55-58, 2009.
- SOUZA, C. M. M.; SILVA H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. L.; ARAÚJO, P. B.M; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- TÉLLEZ, M. G. O.; RODRIGUEZ, H. B.; OLIVARES, G. Q.; SORTIBRÁN, A. N. C.; CETTO, A. A.; ARNAIZ, R. R. A phytoterapeutic 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**, Lausanne, v. 111, p. 182-189, 2007.
- TROUNCE, B.; HANSON. C., AGRICULTURA, S.; IACONIS, L.; THORP, J. **Alert list for environmental weeds Weed management guide Horsetails - equisetum species**. 2003. Disponível em: <<http://www.weeds.gov.au/publications/guidelines/alert/pubs/equisetum.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2010.
- VAZ, A. P. A.; JORGE, H. A. **Cavalinha**. Série plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Embrapa. 2006. Disponível em: <<http://www.campinas.snt.embrapa.br/images/plantas/cavalinha.pdf>>. Acesso em: 3 ago. 2010.
- VIEIRA, M. J. **Análise do setor de plantas medicinais e fitoterápicos - como alternativa de desenvolvimento regional para santa catarina**. 2008. 112 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Programa em Mestrado de Desenvolvimento Regional, UNC, Canoinhas.
- WIEDENFELD, H.; CETTO, A. A.; AMADOR, C. P. Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, p. 395-397, 2000.
- WORLD HEALT ORGANIZATION. WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1998. p. 28.
- XIE, Y.; JIANG, Z. H.; ZHOU, H.; CAI, X.; WONG, Y-F.; LIU, Z-Q.; BIAN, Z-X.; XU, H-X.; LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 43, p. 204-212. 2007.

XU, C. J.; LIANG, Y. Z.; CHAU, F. T.; HEYDEN Y. V. Preatreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1134, p. 253-259, 2006.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Recent approaches in herbal drug standardization. **Journal for biology beyond borders**, India, v. 2, n. 3, p. 195-203, 2008.

YANG, L. W.; WU, D. H.; TANG, X.; PENG, W.; WANG, X. R.; MA, Y.; SU, W. W. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1070, p. 35-42, 2005.

YESILADA, E.; GURBUZ, I. Evaluation of the antiulcerogenic activity of a flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 131, p. 17-21, 2010.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v. 21, p. 381-406, 2001.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. Wine analysis and production. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, Nova lorque, v. 19, p. 2577-2582, 1995.

ANEXO

ANEXO A

Preparo das soluções utilizadas nas análises de caracterização fitoquímica.

Reagente cloreto de alumínio: Pesou-se 1,0000 g de cloreto de alumínio e adicionou-se em balão volumétrico de 50,0 mL, completando-se com solução metanólica de ácido acético.

Solução metanólica de ácido acético: Em balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou 5,0 mL de ácido acético 98% de pureza e o volume foi completado com metanol.

Reagente de Dragendorff: Dissolveu-se 8,0000 g de subnitrato de bismuto em 20,0 mL de ácido nítrico a 30% de pureza. Dissolveu-se, em separado, 22,8 g de iodeto de potássio num volume mínimo de água. Verteu-se a primeira solução pouco a pouco sobre a segunda solução. Deixou-se em repouso durante algumas horas e filtrou-se. Completou-se o volume com água ultrapura para 100,0 mL. Guardou-se ao abrigo de luz.

Reagente de Valser-Mayer: Dissolveu-se em água 2,71 g de cloreto de mercúrio e 10,00 g de iodeto de potássio. Completou-se o volume com água para 200,00 mL, agitou-se e filtrou-se.

Reagente de Bertrand: Dissolveu-se 5,0 g de ácido sílico-túngstico em 100,0 mL de água.