

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO
E FRAÇÕES DA *Equisetum hyemale***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camilla Filippi dos Santos Alves

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO
E FRAÇÕES DA *Equisetum hyemale***

Camilla Filippi dos Santos Alves

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos
Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

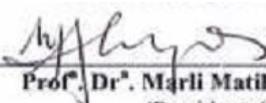
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado:

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO
E FRAÇÕES DA *Equisetum hyemale***

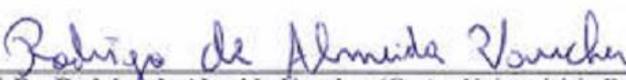
elaborada por
Camilla Filippi dos Santos Alves

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

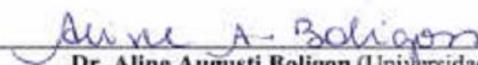
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marli Matiko Anraku de Campos
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Centro Universitário Franciscano)



Dr. Aline Augusti Boligon (Universidade Federal de Santa Maria)

Santa Maria, 27 de novembro de 2015.

*Dedico este trabalho
aos meus orientadores, Margareth (em memória), Roberto e Marli
pelo apoio e confiança,
e aos meus pais, Marco Antônio e Adriane,
pela incansável dedicação, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus e aos espíritos protetores que sempre guiam, protegem e iluminam o meu caminho.

Em memória a minha orientadora Dr^a. Margareth Linde Athayde, pela confiança e todo o conhecimento transmitido na orientação deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Roberto Christ Vianna, pelo apoio, incentivo, ensinamentos e incansável colaboração na construção deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de receber o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e subsídios necessários para que pudesse executar meus experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e atenção e incentivo, em especial a professora Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos pela confiança e apoio, o meu muito obrigada.

À CAPES pela bolsa concedida

O meu muito obrigado a todos os colegas do laboratório de fotoquímica, onde fui muito bem recebida. Os ensinamentos, a colaboração e principalmente a am todos vocês, foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano, que foram incansáveis na colaboração.

Agradeço aos meus pais Marco Antônio e Adriane, por sempre me incentivar e apoiar em todas as minhas escolhas, por me darem base material e moral, pelos exemplos de luta e dedicação, e principalmente pelo amor. Aos meus irmãos Pedro Henrique e Marcos Vinicius pelo apoio, amor e amizade. Muito obrigada, amo vocês.

À toda a minha família, avôs, tios e primos, pelo incentivo e amor. As minhas amigas Natacha Rodrigues e Ariadni Loose, pela amizade, companheirismo e amor.

O meu muito obrigada às minhas colegas e amigas Marcia Ebling e Pauline Cordenonsi Bonez por estarem sempre ao meu lado e serem incansáveis na colaboração.

A todos que de uma forma ou de outra foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada.

*“Os barcos ficam seguros quando estão no porto,
mas não foi para isso que os barcos foram feitos”*

Paulo Coelho

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA *Equisetum hyemale*

AUTORA: CAMILLA FILIPPI DOS SANTOS ALVES
ORIENTADORA: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
Data e Local da Defesa: 27 de novembro de 2015, Santa Maria.

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática milenar, pois os vegetais possuem em sua composição estruturas químicas com importantes atividades farmacológicas. Neste estudo destacamos a espécie *Equisetum hyemale*, pertencente ao filo *Sphenophyta* e família *Equisetaceae*. Trata-se de uma planta aérea, comumente encontrada em climas tropicais e temperados. A infusão das hastes da planta é utilizada popularmente como diurético, anti-hipertensivo e para tratamento de doenças infecciosas e inflamações. Todas as espécies do gênero são conhecidas como Cavalinha. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico bem como avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e antiparasitária do extrato bruto e frações da *E. hyemale*. A planta foi coletada no município de Santa Maria, distrito de São Martinho da Serra, em novembro de 2013. A exsiccata do material foi depositado no Herbário da Engenharia Florestal da UFSM, catalogado sob o número de registro 6756. O material foi macerado com etanol (70%) e filtrado, obtendo-se o extrato aquoso uma parte foi reservada para a obtenção do extrato bruto e o extrato etanólico foi evaporado. O restante foi particionado em ampolas de separação, utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e butanol, sendo que o extrato bruto foi obtido pela secagem do extrato aquoso. Foram realizados os doseamentos de flavonóides e polifenóis totais através da técnica de quantificação por colorimetria. Para determinar a capacidade antioxidante foi utilizada a técnica de DPPH. Os ácidos fenólicos foram identificados e quantificados por CLAE-DAD. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da técnica de microdiluição em caldo e a capacidade redutora de formação de biofilme através da técnica de cristal violeta. Para a avaliação da atividade antiparasitária foi utilizada a técnica de microtitulação. Os resultados obtidos nos doseamentos de polifenóis totais e flavonóides mostram que os teores de compostos fenólicos, foram maiores no extrato bruto, sendo de $97,76 \pm 0,65$ mg/g para polifenóis e $43,65 \pm 1,24$ mg/g para flavonóides. O ensaio de DPPH revelou uma capacidade intermediária, para atividade redutora de radicais livres, apresentando um IC_{50} $86,55 \mu\text{g/ml}$ para o extrato bruto. As análises por CLAE revelaram a presença de ácido rosmarínico na fração diclorometano ($7,38 \pm 0,08$ mg/g FS) e ácido cloregênico na fração acetato de etila ($8,4 \pm 0,26$ mg/g FS). O extrato bruto e as frações apresentaram atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC35985, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. aureus* ATCC 33691, *S. aureus* resistente a metilicina (isolado clínico), *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. flexneri* ATCC 12022323A, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PA01, *K. pneumoniae* ATCC 1705, em concentrações entre 52,4 mg/ml e 3,27 mg/ml. Frente a espécies de *Candida* as concentrações inibitórias variaram entre 52,4 mg/ml a 6,5 mg/ml, e frente a espécies de *Mycobacterium* os valores das menores concentrações capazes de inibir o crescimento do microrganismo ficaram entre 2,5 mg/ml e 0,625 mg/ml. Quanto aos ensaios de redução da formação de biofilmes o maior percentual de redução pode ser observado na fração diclorometano, que na maior concentração foi capaz de reduzir 83% do biofilme formado por *P. aeruginosa* e 51% do biofilme formado por *C. albicans*. Para o teste antiparasitário, pode ser observado a redução de 100% do *T. evansi*, após 9h, quando expostos ao extrato bruto e a fração N-butanol. Este estudo demonstra pela primeira vez a atividade antiparasitária e antibiofilme do extrato bruto e frações das hastes da *E. hyemale*.

Palavras –chave : *Equisetaceae*; Compostos fenólicos; Biofilme; CLAE

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACT CRUDE AND FRACTION OF *Equisetum hyemale*

AUTHOR: CAMILLA FILIPPI DOS SANTOS ALVES

ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Day and Place of the Defense: November 27th, 2015, Santa Maria.

The use of plants for medicinal purposes is an ancient practice because vegetables have in its composition chemical structures with important pharmacological activities. In this study we highlight the *hyemale Equisetum* species, belonging to the phylum Sphenophyta and Equisetaceae family. This is an aerial plant, commonly found in tropical and temperate climates. The infusion of plant stems is popularly used as diuretic, antihypertensive and for the treatment of infectious diseases and inflammations. All species of the genus are known as Horsetail. This study aimed to carry out a phytochemical study and evaluate the antioxidant activity, antimicrobial, and anti-parasitic antibiofilm the crude extract and fractions of *E. hyemale*. The plant was collected in the municipality of Santa Maria, district of São Martinho da Serra, in November 2013. The voucher specimen of the material was deposited in the Herbarium UFSM Forestry, cataloged under the registration number 6756. The material was macerated with ethanol (70%) and filtered to afford a portion of the aqueous extract was reserved for obtaining the crude extract and ethanol extract was evaporated. The remainder was partitioned into separate vials using increasingly polar solvents: dichloromethane, ethyl acetate and butanol, and the crude extract was obtained by drying the aqueous extract. Assays of flavonoids and polyphenols totas through the colorimetric quantification technique were performed. To determine the antioxidant capacity was used DPPH technique. The phenolic acids were identified and quantified by HPLC-DAD. The antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution technique and the reductive capacity of biofilm formation by crystal violet technique. To evaluate the antiparasitic activity was used to microtiter technique. The results obtained in the determinations of total polyphenols and flavonoids show that the levels of phenolic compounds, in the crude extract was higher, being 97.76 ± 0.65 mg / g for polyphenols and 43.65 ± 1.24 mg / g for flavonoids. The DPPH assay revealed an intermediate capacity reduction for activated free radical, having an IC50 of 86.55 ug / ml for crude extracts. The HPLC analyzes revealed the presence of rosmarinic acid in dichloromethane fraction (7.38 ± 0.08 mg / g FS) and cloregênico acid in ethyl acetate fraction (8.4 ± 0.26 mg / g FS). The crude extract and fractions showed antimicrobial activity, being capable of inhibiting growth of *E. faecalis* ATCC 29212 *S. epidermidis* ATCC35985, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. aureus* ATCC 33691, *S. aureu* resistant to methicillin (clinical isolate) *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* ATCC 13076, ATCC 12022323A *flexineri* S., *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PA01, *K. pneumoniae* ATCC 1705, at concentrations of 52.4 mg / ml and 3.27 mg / ml. Head *Candida* species inhibitory concentrations ranged from 52.4 mg / ml to 6.5 mg / ml, and in front *Mycobacterium* species in the smaller values concentrations able to inhibit growth of the microorganism were between 2.5 mg / ml and 0.625 mg / ml. As regards the reduction of biofilm formation testing the largest percentage of reduction can be seen in dichloromethane fraction, which was the highest concentration able to reduce 83% of the biofilm formation by *P. aeruginosa* and 51% of *C. albicans* biofilm formed. To test the antiparasitic, can be observed the decrease of *T. evansi* 100% after 9h, when exposed to crude extract and N-butanol fraction. This study demonstrates for the first time antiparasitic activity and antibiofilm the crude extract and fractions of rods *E.hyemale*.

Key- words Equisetaceae. Phenolic compounds. Biofilm. HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arquivo pessoal do autor.....	20
Figura 2- Planta na natureza (Fonte: Native revival nursery-Creating california-native gardens)_.....	21
Figura 3- Ciclo de um biofilme. 1) Adesão; 2) Crescimento; 3) Propagação ou Dispersão.(Fonte: Hypertextbooks.shop).....	34
Figura 4- Fluxograma do processo de fracionamento.....	37
Figura 5- Cromatograma representando no comprimento de onda de 327 nm obtido do extrato bruto de <i>E.hyemale</i> . por CLAE/DAD. Picos: 1 – Polifenol não identificado.	46
Figura 6- A- Gráfico DAD Espectro de absorção 230-400nm, do pico em 19.17min. B - Gráfico DAD do padrão ácido clorogênico.....	46
Figura 7- Cromatogramas representados no comprimento de onda de 327 nm, obtido da fração diclorometano (DCM) das hastes de <i>E. hyemale</i> por CLAE/DAD. Picos: 1 – polifenol não identificado, 2-Derivados do ácido caféico. 3 – ácido rosmarínico.	47
Figura 8- Cromatogramas representados no comprimento de onda de 327 nm, obtido da fração acetato de etila (EA) das folhas de <i>E. hyemale</i> por CLAE/DAD. Picos: 1 - não identificado, 2- ácido clorogênico, 3-Polifenol e 4 - ácido rosmarínico.....	48
Figura 9- Efeito do extrato bruto da <i>E. hyemale</i> sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> (A) e <i>P. aeruginosa</i> (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Erro padrão da média. a-Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo.	55
Figura 10- Efeito da fração diclorometano da <i>E. hyemale</i> , sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> (A) e <i>P. aeruginosas</i> (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Erro padrão da média). a-Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo	56
Figura 11- Efeito da fração AE da <i>E. hyemale</i> sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> (A) e <i>P. aeruginosas</i> (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Erro padrão da média). a Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo.....	58
Figura 12- Efeito da fração NB da <i>E. hyemale</i> , sobre a formação de biofilme de <i>C.albicans</i> (A) e <i>P. aeruginosas</i> (B). Os valores são expressos como absorbância em 570nm. (Média ± Erro padrão da média). a Diferença significativa com relação ao controle negativo. b - Diferença significativa com relação ao controle positivo.....	58

Figura 13- Análise do biofilme formado através da técnica de Calcofluor Branco. As imagens foram obtidas através de microscopia ótica em aumento de 10x. A - Controle negativo: Somente meio de cultivo. B - Controle positivo: meio de cultivo + *C. albicans*. C –Meio de cultivo + *C. albicans* + o EB da *E. hyemale*, na concentração do CIM. D - meio de cultivo + *C. albicans* + fração DCM da *E. hyemale*, na concentração do CIM. E- meio de cultivo + *C. albicans* + fração AE da *E. hyemale* na concentração do CIM. F- meio de cultivo + *C. albicans* + fração NB da *E. hyemale* na concentração do CIM. 60

Figura 14- Efeito do extrato bruto da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$), ao mesmo tempo (h). 61

Figura 15- Efeito das frações acetato de etila da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h). 62

Figura 16- fração diclorometano da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura , foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h). 63

Figura 17- Efeito das frações n-butanol da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teor de polifenóis e flavonoides no extrato bruto e frações das folhas de <i>E. hyemale</i>	44
Tabela 2- Teor de compostos fenólicos no extrato bruto e frações das folhas de <i>E. hyemale</i> por CLAE/DAD.....	49
Tabela 3- Capacidade antioxidante pelo método do DPPH expressos em IC50 do extrato bruto e frações das folhas de <i>E. hyemale</i> -	50
Tabela 4- Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de <i>E. hyemale</i> frente a bactérias..	51
Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de <i>E. hyemale</i> frente a espécies de <i>Candida</i>	53
Tabela 6- Concentração inibitória mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações da <i>E. hyemale</i> frente a cepas de <i>Mycobacterium</i>	54

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – absorbância
AcOEt – acetato de etila
ACG – ácido clorogênico
AR – ácido rosmarínico
BuOH – butanol
CH₂Cl₂ – diclorometano
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EB – extrato bruto
ERO – espécie reativa de oxigênio
MS – espectrômetro de massas
min. - minuto
mg/g – miligramas por grama
tR – tempo de retenção
UV – ultravioleta
µl – microlitros
µg/ml – micrograma por mililitro
AE- fração Acetato de etila
NB- fração n-butanol
DCM- fração diclorometano
CIM- concentração inibitória mínima
EPS- camada de exopolissacarídeos

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3.1 Descrição do gênero Equisetum	19
3.1.1 Descrição da espécie <i>E. hyemale</i>	21
3.2 Metabólitos secundários e atividades biológicas relacionadas ao gênero Equisetum	22
3.3 Capacidade antioxidante	23
3.4 Atividade antimicrobiana	25
3.4.1 Atividade antibacteriana.....	25
3.4.3 Atividade antifúngica	27
3.4.5. Atividade antiparasitária	29
3.5 Biofilmes	31
3.5.1 Estrutura e composição dos biofilmes.....	32
3.5.2 Formação do biofilme	33
3.5.3 Importância clínica dos biofilmes	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 Materiais utilizados	36
4.1.1 Material Vegetal.....	36
4.1.2 Substância química de referência	36
4.2 Métodos	37
4.2.1 Obtenção do extrato das hastes do vegetal.....	37
4.2.2 Fracionamento dos extratos.....	37
4.3 Análises fitoquímicas	38
4.3.1 Doseamento de polifenóis totais	38
4.3.2 Doseamento de flavonóides	38
4.3.3 Delineamento do perfil cromatográfico por CLAE-DAD.....	38
4.4 Capacidade antioxidante	39
4.4.1. Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH	39
4.5 Determinação da atividade antimicrobiana	40
4.5.1 Determinação da CIM para bactérias	40
4.5.2 Determinação da CIM para espécies de <i>Candida</i>	40
4.5.3 Determinação da CIM para espécies de <i>Mycobacterium</i>	40
4.6 Atividade antibiofilme	41
4.6.1 Ensaio de formação de biofilme	41

4.6.2 Análise qualitativa do biofilme formado coloração de Calcofluor branco.....	42
4.7 Avaliação da atividade antiparasitária.....	42
4.8 Estatística	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 Análise fitoquímica	43
5.1.1 Doseamento de polifenóis totais e flavonoides	43
5.2 Capacidade antioxidante.....	49
5.2.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH	49
5.3 Atividade antimicrobiana	50
5.3.1 Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de <i>E. hyemale</i> frente á bactérias.....	50
5.3.2 Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de <i>E. hyemale</i> para espécies de <i>Candida</i>	52
5.4 Atividade antibiofilme.....	55
5.4.1 Capacidade de inibição de biofilme	55
5.4.2 Análise qualitativa do biofilme formado de <i>C. albicans</i> coloração de Calcofluor branco.	59
5.5 Atividade antiparasitária	61
6 CONCLUSÕES	65
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

As propriedades terapêuticas existentes nas plantas foram sendo descobertas através da observação e experimentação feitas pelos povos primitivos e assim foram propagadas de geração em geração fazendo parte da cultura popular. Existem relatos do uso de plantas com finalidades curativas por volta de 3000 a.C. pelos povos orientais (WAGNER e FARNSWORTH,1990; CHANG e BUT, 1987). A partir do século XIX, algumas dessas plantas passaram a fazer parte da farmacopeia alopática e homeopática, quando começou-se a investigar suas bases farmacológicas. (ELVIN-LEWIS, 2001). Tendo sempre como base a medicina tradicional, surgiu a necessidade de realizar-se estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas e assim surgiram os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como por exemplo o ácido acetilsalicílico, digoxina, morfina, quinina e pilocarpina (BUTLER, 2004).

A vasta biodiversidade brasileira ainda não é totalmente conhecida devido a sua complexidade. Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, sendo que as metades destas espécies encontram-se nas florestas tropicais (DIAS,1996). Entretanto, apenas 8% da flora brasileira foi estudada a fim de encontrar novos compostos bioativos e 1100 espécies tiveram suas propriedades medicinais avaliadas. Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para a comercialização (GUERRA e NODARI, 2003).

Embora cerca de 100.000 compostos oriundos de plantas tenham sido identificados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de encontrar-se novas e diferentes estruturas com atividades importantes à saúde e à agricultura (YUNES e CALIXTO, 2001). Neste contexto, é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pesquisas com plantas medicinais para fins curativos, no intuito de obter novas alternativas terapêuticas. Para garantir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer necessariamente estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. São denominados fitoterápicos todos os medicamentos obtidos exclusivamente de ativos

vegetais, que possuem uma caracterização química e atividade farmacológica definida. Estes podem ser tão eficientes quanto os fármacos sintetizados quimicamente (ANVISA, 2006).

A relação entre as atividades biológicas das plantas e seus componentes é responsável pelo grande avanço das pesquisas na descoberta de metabólitos secundários. No vegetal esses compostos possuem como função, adaptar a planta ao meio, atrair polinizadores e repelir insetos. A estrutura e classe de compostos variam e alguns são restritos a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT e WALLSGROVE, 1994). Farmacologicamente, os metabólitos secundários possuem diversos efeitos, como atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, visto que são capazes de atuar modulando células envolvidas com a inflamação e antimicrobiana (HAVSTEEN, 2002; COUTINHO et al, 2009).

Alguns dos principais metabólitos secundários fazem parte do grupo dos polifenóis, que são substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático. Fazem parte desse grupo taninos, ligninas, derivados do ácido caféico e flavonóides (SULTANA e ANWAR, 2008). Os ácidos fenólicos estão divididos em três grupos. O primeiro grupo são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza é composto pelos ácidos benzoicos que possuem sete átomos de carbono. Fazem parte do segundo grupo os ácidos cinâmicos que possuem nove átomos de carbono, sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal, a partir da ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico, as cumarinas derivam do ácido cinâmico. E por fim o terceiro grupo que são os ácidos fenólicos ligados entre si ou com outros ácidos, como por exemplo, ácido cafeico associado a um álcool-ácido cíclico origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas não acompanha o crescimento do número de microrganismos resistentes. As bactérias possuem elevada capacidade de mobilizar genes de resistência, o que faz com que casos de bactérias super-resistentes sejam mais frequentes, e tudo isso é consequência do uso indiscriminado dos fármacos disponíveis atualmente. As infecções fúngicas, principalmente as candidíases, infecções por micobacterias e parasitas não são exceção nos casos de cepas resistentes. (CUENCA-ESTRELLA et al, 2010; VAN INGEN et al, 2005; BRANDELLI et al, 2009 e HOIBY et al, 2011).

Os microrganismos podem estar circulando livremente ou então aderidos á alguma superfície sob a forma de estruturas complexas a qual chamamos de biofilmes. Os biofilmes podem ser formados por bactérias, fungos e/ou protozoários. A partir da associação entre esses microrganismos, ocorre a formação de uma matriz de polímeros orgânicos, com isso, substancias como antimicrobianos e antisséptico encontram dificuldades para penetrar no biofilme, dificultando ainda mais o tratamento (BRUNTON et al, 2006).

As pesquisas envolvendo plantas medicinais são de grande importância, tem-se verificado avanços científicos, envolvendo estudos químicos e farmacológicos, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Diante disso, destacamos a espécie *Equisetum hyemale*, pertencente ao filo *Sphenophyta* e família *Equisetaceae*. Trata-se de uma planta aérea, comumente encontrada em climas tropicais e temperados. Sua morfologia é de folhas muito reduzidas e caule aéreo fistuloso, que se assemelham com um rabo de cavalo e por este motivo recebe o nome popular de cavalinha. É utilizada na medicina popular como agente diurético, hemostático, anti-hipertensivo, anti inflamatório e também para tratar distúrbios hepáticos e urinários. Uma vez que possui alto teor de flavonóides na parede celular da planta, que são constituídas majoritariamente por flavonas glicosiladas e quercetina (VEIT et al, 1995; LI et al, 2012 e HILGERT et al, 2001). Motivou-nos a realizar esta pesquisa a fim de definir a composição química da *E.hyemale*, bem como avaliar as suas atividades biológicas, relacionando com os seus componentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a composição fitoquímica de *E. hyemale*, bem como avaliar sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e antiparasitária.

2.2 Específicos

- Realizar doseamento de flavonóides e polifenóis totais no extrato bruto e frações através de ensaios colorimétricos;

- Delinear o perfil cromatográfico da espécie, a fim de identificar sua composição química do extrato bruto e frações da *E.hyemale* por CLAE-DAD;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações, através dos métodos do 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH);
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana, através da microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar a atividade anti-*Mycobacterium* através da técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Verificar, através do ensaio de microdiluição em placa, a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CIB) do extrato bruto e frações da espécie;
- Analisar qualitativamente a formação de biofilme através da técnica de coloração de calcofluor branco;
- Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* frente a *Trypanossoma evansi* através da técnica de microtitulação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Descrição do gênero *Equisetum*

O *Equisetum* é o único gênero que representa a família *Equisetaceae*. Trata-se de plantas de pequeno porte que raramente atingem um metro de altura, apresentam folhas muito reduzidas e caule aéreo que possui nós e entrenós característicos de 0,7 a 4 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento. Possuem brotos aéreos perpendiculares e rizomas subterrâneos, sendo quase uniformes quanto à altura, ascendentes e com nervuras. Assemelham-se com um rabo de cavalo e por este motivo, todas as espécies do gênero são conhecidas popularmente como cavalinha, como pode ser visualizado na figura 1 (GUIMARÃES, 1983; RADULOVIC et al, 2006).

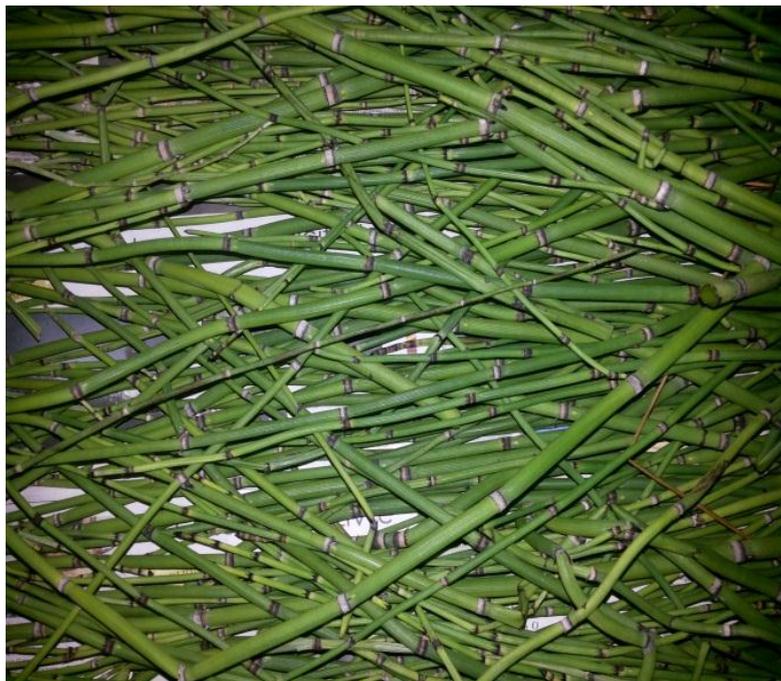


Figura 1-Arquivo pessoal do autor.

Descrito pela primeira vez por Lineu, em 1753, o gênero *Equisetum* pertence ao filo *Sphenophyta*, sendo uma das formas de vida vegetais mais antigas, originária no fim da era paleolítica há cerca de 300 bilhões de anos. São conhecidas aproximadamente 30 espécies que se distribuem uniformemente pela maioria dos continentes, não estando presente apenas na Austrália e Antártida. Suas folhas são muito pequenas, por este motivo a fotossíntese ocorre em sua maioria nas células externas das hastes. Algumas espécies do gênero possuem ramos aéreos perenes, ou seja, qualquer ramo pode formar órgão reprodutivo, porém a maioria das espécies tem ramos vegetativos e reprodutivos separados. Os rizomas podem atingir até 2 m de comprimento abaixo do solo, dificultando a erradicação do vegetal em caso de invasão de campos e lavouras (NIKLAS, 1989).

A cavalinha é comumente encontrada em climas tropicais e temperados, principalmente na América central, América do sul e Brasil devido, provavelmente, à proximidade geográfica. Na primavera a planta apresenta brotos férteis e não ramificados da cor marrom, e no verão apresentam brotos inférteis verdes e sua multiplicação se dá pela divisão dos rizomas ou através dos esporos (OH et al, 2004; HOHLFELD et al, 1996).

De uma maneira geral, as espécies do gênero *Equisetum* são utilizadas as hastes da planta na medicina popular, na forma de infusões, como diurético, digestivo, antianêmico, anti-inflamatório e antimicrobiano, sendo empregada também no

tratamento de gonorréia, diarreia, infecções dos rins, bexiga e doenças oculares. No Brasil, a espécie *E. arvense* está inserida na relação nacional de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da hipertensão arterial. Apesar de não haver espécies de *Equisetum* oficializadas na farmacopéia brasileira, a utilização dessas plantas no tratamento de algumas patologias está relacionada com a presença de altos teores de minerais, principalmente silício e metabólitos secundários, como por exemplo, saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides, que atuam de forma sinérgica (REUTER et al, 2010; HOLZHUTER et al, 2003).

3.1.1 Descrição da espécie *E. hyemale*

A espécie *E. hyemale* apresenta hastes verdes cilíndricas, que possuem no máximo 0,8 cm de diâmetro que atingem até 3m de altura (figura 2). As hastes geralmente não são ramificadas e possuem sulcos longitudinais ásperos, suas folhas são pequenas e unidas no entorno das hastes. Não floresce, sua reprodução se dá pela capacidade de produção de esporos (PARK e JEON, 2008). Os esporos se diferenciam, tanto no aspecto morfológico como no fisiológico, pois são pequenos, tem alto teor de água, taxa de respiração elevada, com paredes muito finas o que facilita a dissecação. Em condições ideais, com concentrações de substrato e elevada umidade relativa, os esporos germinam facilmente, porém quando estão em temperatura ambiente (25 °C) eles permanecem viáveis por apenas duas semanas se estiverem protegidos da dissecação (LEBKUECHER, 1997).



Figura 2- Planta na natureza (Fonte: Native revival nursery-Creating california-native gardens)_

O gênero *Equisetum* é bem descrito na literatura, porém, quando se trata da espécie *E. hyemale*, poucos registros que relacionem suas atividades biológicas com seus componentes, são encontrados.. Recentemente, foi relatado que os extratos etanólicos e metanólicos de *E. hyemale* possuem em sua constiuição compostos fenólicos, que são os responsáveis pelas atividades de eliminação de radicais livres e anti-fúngica (QUEIROZ et al, 2015) Testes como de atividade antifúngica, já foram realizados com extratos de *Equisetum arvense*, que demonstrou ser eficaz na inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* e na produção de afloxotinas. A mesma espécie na concentração de 50 mg/mL inibiu totalmente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata*. Resultados como esses demostram que o gênero *Equisetum* possui um grande potencial para ser utilizado como alternativa de tratamento para diversas infecções (ROMERO et al., 2005; OLIVEIRA et al, 2013).

3.2 Metabólitos secundários e atividades biológicas relacionadas ao gênero *Equisetum*.

O gênero *Equisetum* é conhecido como o maior acumulador de sílica entre as plantas terrestres, apresentando em sua estrutura, aproximadamente 25% da massa seca composta por sílica. Este composto é derivado do ácido silícico do solo, tendo como funções a prevenção da perda excessiva de água, a reflexão de luz excessiva e proteção contra os predadores. Além disso, é capaz de promover resistência mecânica para as plantas e fazer a construção de paredes celulares mais hidrofóbicas (YAMANAKA et al, 2012).

Existem no mínimo duas formas distintas de sílica que podem ter diferentes funções. Existe uma estreita associação da sílica com os polímeros da parede celular, sugerindo que ela podem atuar como molde que controla a forma e o tamanho das partículas da sílica. A maior parte da sílica biomineralizada das espécies do gênero *Equisetum* encontra-se acumulada na camada epidérmica, diminuindo a partir das paredes mais externas, conferindo o papel importante da sílica, na proteção da planta contra herbívoros, insetos, doenças e aumento da flexão e rigidez da planta, levando-se em conta que se trata de uma planta perene (SAPEI et al, 2007).

Os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas, geralmente estão intimamente relacionados com os metabólitos secundários, os quais possuem como função adaptar o

vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico (VANHAELEN et al., 1991). Os metabólitos secundários são compostos químicos distintos dos intermediários e dos produtos do metabolismo primário. Eles variam de acordo com a espécie vegetal e a família e alguns são restritos a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT e WALLSGROVE, 1994).

Neste contexto, foi realizado um estudo que identificou a presença de compostos fenólicos em algumas espécies do gênero *Equisetum*, como no caso da *E. hyemale*, que é rica em flavonoides (VEIT et al, 1995). Essas estruturas têm a função de atrair agentes polinizadores e repelir alguns insetos. Os compostos fenólicos são principalmente ativos biologicamente contra bactérias, fungos, vírus, além de apresentarem atividade anti-inflamatória e antioxidante (ORHAN et al, 2010).

Foram identificados, compostos como canferol e quercetina a partir de extratos de *E. giganteum*. As espécies *E. giganteum* e *E. bogotense* possuem valores dez vezes mais elevados de canferol comparados com a quercetina. Por outro lado, a espécie *E. arvense* demonstrou valores mais elevados nas concentrações de quercetina do que canferol e maiores dosagens de flavonóides totais (FRANCESCATO et al, 2013). O extrato etanólico de *E. arvense* também apresentou significativas atividades antioxidante e antimicrobiana frente as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*, sendo a mais potente dessas atividades frente as bactérias Gram positivas. Tais resultados podem ser justificados pelas altas dosagens de compostos fenólicos (KUKRIC et al, 2013).

3.3 Capacidade antioxidante

A capacidade que os flavonóides possuem de remover radicais livres tem recebido uma atenção especial, pois, a atividade antioxidante desses, deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA et al, 2007).

Recebem o nome de radicais livres ou espécies reativas do oxigênio, todas as espécies químicas constituídas de um átomo ou associação dos mesmos, que possuem um elétron desemparelhado em sua orbita mais externa. Esse elétron desemparelhado faz com que o átomo se torne altamente instável cineticamente e energeticamente, o que faz com eles necessitem doar ou receber elétrons de outras moléculas a fim de se tornarem mais estáveis. Distribuídos em dois grupos, os principais EROS são: Hidroxila (OH), superóxido (O_2), peroxila (ROO) e alcoxila (RO); e os ERN incluem-se óxido nítrico ($NO\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) e peroxinitritos (ONOO). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (BARREIROS et al, 2006).

Quando ocorre um aumento nos níveis de radicais livres e deficiência enzimática e não enzimática de antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, onde uma cadeia de reações resulta em danos na produção de lipídios celulares, proteínas e no DNA. A partir da formação de radicais livres o organismo desenvolve uma série de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, que se dividem em defesas antioxidantes enzimáticas, que se tratam principalmente das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GP_x) e catalase (CAT), e as não antioxidantes, são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutaciona (GSH), carotenóides, flavonóides, entre outros (VALKO et al, 2006).

A peroxidação dos ácidos graxos é o dano mais comum causado pelo estresse oxidativo, causando apoptose e multiplicação celular desregulada. Devido a isso, implica no desenvolvimento de diversas doenças, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, bem como no processo de envelhecimento (HIDRATA et al, 2004). Além disso, evidenciou-se a ocorrência do estresse oxidativo em diversas células cancerígenas em comparação com células normais, assim pode-se estabelecer uma relação desse processo com a estimulação de células oncogênicas. (MARNETT, 2000; VALKO et al, 2006).

Outro exemplo é o peróxido de hidrogênio, que isoladamente não apresenta atividade radical, porém, sua facilidade em atravessar a membrana celular, proporciona o contato com metais de transição ou com oxigênio singleto, produzindo assim, radicais hidroxilas, que são muito nocivos pela impossibilidade de serem sequestrados *in vivo*. Deste modo, observa-se que os metais de transição possuem um papel semelhante aos radicais livres, tendo em vista que desempenham uma atividade vital na inibição do

processo mediado por essas espécies reativas (BARREIRA et al., 2008; SANTOS, 2011).

Os compostos fenólicos das plantas como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos, lignanas e ligninas têm recebido muita atenção, pois a atividade antioxidante desses deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA et al, 2007).

Liljana e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antioxidante do extrato bruto da *E. arvense*, utilizando o método DPPH, nas concentrações de 10 µg/ml o extrato da *E. arvense* apresentou um acentuado aumento dos efeitos de eliminação dos radicais livres DPPH. A avaliação da capacidade antioxidante depende da composição do extrato e também do método utilizado para avaliação, por esse motivo é importante que se realize mais de um teste para a confirmação desta atividade.

3.4 Atividade antimicrobiana

3.4.1 Atividade antibacteriana

A consequência inevitável do uso disseminado dos antimicrobianos foi o aparecimento de patógenos resistentes os fármacos que atualmente estão em uso na clínica. Diante disso há uma preocupação em buscar novos compostos que sejam capazes de combater os microrganismos resistentes, Porém, o ritmo de desenvolvimento de novos antimicrobianos diminuiu drasticamente (BRUNTON et al, 2006).

A resistência microbiana é a da capacidade que os microrganismos adquirem, em se multiplicar mesmo na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as que propõem as doses terapêuticas dadas a humanos. O principal fator determinante para a evolução do microrganismo talvez, seja a elevada capacidade bacteriana em mobilizar genes de resistência. Elementos genéticos móveis possibilitam a mobilização de múltiplos genes permitindo a sobrevivência de microrganismos sob

pressão seletiva de antimicrobianos de diferentes classes. Neste contexto, os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas que possuem capacidade de replicação independente e mobilização de genes de resistência de uma célula bacteriana para outra (transmissão horizontal), não se limitando à transferência intraespécies (FROST et al, 2005).

Nos Estados Unidos da América, são altos os custos anuais adicionais associados a infecções causadas por microrganismos resistentes, em comparação com microrganismos sensíveis. A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) reconhece a resistência aos antimicrobianos como uma das maiores ameaças para a saúde humana em todo o mundo. Além disso, a resistência antimicrobiana foi o foco do Dia Mundial da Saúde em 2011 da Organização Mundial de Saúde (OMS). O impacto da resistência a múltiplos fármacos (MDR) estende-se a todos os aspectos da medicina e ameaça os progressos significativos que foram realizados nas áreas de transplante, oncologia, cirurgia e infectologia nos últimos anos (SPELLBERG et al, 2011).

Tammer e colaboradores (2014) Verificaram a incidência de patógenos e a taxa de resistência de isolados de pacientes da unidade cirúrgicas normais e UTI (Unidade de Tratamento Intensivo), durante o período de cinco anos. Foram isolados de enterobactérias, e *Enterococcus*, e período de 2007 a 2011 houve um aumento da resistência contra a ciprofloxacina, imipenem e piperacilin. Com isso a densidade do uso de antimicrobianos aumentou 1,4% ao ano. As altas taxas de absorção de fluoroquinolonas e carbapenens foram acompanhados por aumentos de resistências. Os casos de resistência são influenciados pela gestão da higiene e diagnósticos microbiológicos para evitar que o antimicrobiano seja utilizado de forma empírica . O uso extensivo de carbapenens deve ser reavaliado em ambas as unidades para controlar o desenvolvimento da resistência aos fármacos.

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias, porém, o uso indiscriminado desses fármacos está fazendo com que os microrganismos se tornem resistentes á elas. Uma alternativa para o tratamento de infecções são as plantas medicinais. O seus compostos isolados ou agindo em sinergismo podem ser uma potente fonte de novos antimicrobianos. Entretanto, nos últimos anos poucos fármacos foram incluídas para a terapêutica antimicrobiana. Os programas de descoberta de antimicrobianos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, contudo, para que

esses compostos possam ser utilizados com eficácia e segurança, é necessário que sejam realizados estudos aprofundados (GUIMARÃES et al, 2010).

Embora existam poucos relatos na literatura que trazem a atividade antimicrobiana do *E. hyemale*, recentemente, foi identificado que os extratos etanólicos e metanólicos de *E. hyemale* eram constituídos principalmente por compostos fenólicos. Esses extratos também possuem atividade de eliminação de radicais livres, atividade anti-fúngica contra fungos dermatófitos, com a concentração mínima inibitória e concentração fungicida mínima de 0,62 mg/mL para *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* (QUEIROZ et al, 2015).

Estudos com outras espécies são mais frequentes. O extrato da *E. arvense* apresentou uma atividade antimicrobiana com CIM de 50 mg/mL frente à *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e com CIM de 25 mg/mL apresentou atividade frente *Streptococcus mutans*. Atribuem-se à presença de vários compostos, tais como o timol, a responsabilidade pela atividade antimicrobiana. Também foram testados os óleos essenciais que demonstraram uma grande efetividade frente à Gram negativos como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* e *E. coli*. O extrato etanólico de *E. arvense* também apresentou significativas atividades antioxidante e antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*, sendo a mais potente dessas atividades frente as bactérias Gram positivas. Tais resultados podem ser justificados pelas altas dosagens de compostos fenólicos (KUKRIC et al., 2013; OLIVEIRA et al, 2013).

3.4.3 Atividade antifúngica

Os fungos são seres eucariotos, heterotróficos e possuem parede celular. Podem ser encontrados na água, no solo, nos vegetais, no ar, nos animais e em detritos em geral. Quando em sua estrutura apresenta apenas um núcleo são classificados como leveduras e quando apresentam mais de um núcleo são fungos filamentosos e apresentam micélios. São potenciais patógenos para os seres humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. As micoses são classificadas em superficiais; micoses da pele, unhas e pêlos; micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas, de acordo com os tecidos e órgãos afetados (TRABULSI, 1991).

A frequência das infecções fúngicas sistêmicas, principalmente as oportunistas invasivas, têm crescido drasticamente. Entre estas, a mais comum é a candidíase, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade. As infecções da corrente sanguínea causadas por fungos aumentaram, sendo que 80% são causadas por espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo considerada a quarta causa de sepse. O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. A anfotericina B e os azóis - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia (BECKE-SAGUE et al, 1993, EDMOND et al, 1999 e MARTIN et al, 2003).

O principal efeito indesejável do uso indiscriminado de antimicrobianos é o aparecimento das cepas resistentes, e os antifúngicos não são exceção. O aumento da prevalência de infecções fúngicas, levam ao aumento do uso de antifúngicos, o que acarreta no aparecimento de algumas cepas resistente a esses fármacos. As micoses sistêmicas são infecções oportunistas que ocorrem em pacientes com fatores predisponentes e o fato da cepa ser sensível ao tratamento, traz maiores complicações a esse quadro clínico. Os casos mais relevantes atualmente são a resistência de leveduras ao fluconazol, *Aspergillus* ao itraconazol e a diminuição da sensibilidade de algumas espécies ao voriconazol. Ainda são pouco frequentes os relatos de cepas resistentes a Anfotericina B e fluorocisteína (CUENCA-ESTRELLA et al, 2010).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos, envolvendo plantas e atividade antifúngica. Dentre as plantas mais citadas destacam-se a atividade dos óleos voláteis de, *Rosmarinus officinalis L.* e *Schinus molle L.* Atribui-se a atividade antifúngica dos óleos voláteis, a presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois: citral, geraniol, linalol e timol, pois tais compostos têm alto poder antimicrobiano, superior ao do próprio fenol (SIMÕES e SPITZER, 2003) Os compostos fenólicos, são geralmente relacionados com a maioria dos efeitos biológicos apresentados pelos vegetais, que incluem principalmente os efeitos antioxidantes e atividades antimicrobiana. O bruto da *E. arvense* demonstrou atividade antifúngica quando testado frente á cepas de *A. flavus*, *Fusarium verticillioides*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata*. A alta atividade antifúngica dos extratos foi justificado pela presença de compostos fenólicos na composição da planta (QUEIROZ et al, 2015, GARCIA et al, 2012, OLIVEIRA et al, 2013).

3.4.4. Atividade antimicobacteriana

O gênero *Mycobacterium* é constituído de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e pertence à ordem dos Actinomicetales, subordem Corynebacteriacea, família Mycobacteriaceae. Neste incluem-se *M. leprae*, espécies altamente patogênicas como do complexo *M. tuberculosis* (CMTB), causadores da tuberculose, e outras espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT) (UEKI et al, 2005).

As MNT são encontradas como microrganismos comensais, saprófitos, simbióticos ou potenciais e reconhecidas cada vez mais como agentes causadores de infecções oportunistas em seres humanos. Entre as razões para o aumento de situações clínicas causadas pelos bacilos, encontram-se as infecções em indivíduos imunodeprimidos e o aprimoramento das técnicas de cultura e identificação das micobactérias (GRIFFITH et al, 2007). O estudo das MNT vem despertando o interesse de muitos pesquisadores devido ao seu poder letal em pacientes imunocomprometidos e às dificuldades encontradas no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (VAN INGEN et al, 2012).

Um estudo realizado com as folhas da *Scutia buxifolia* Reissek, identificou a presença de compostos flavonóides (quercitina) e ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido caféico). Os mesmo extratos foram testados frente a cepas de MNT, onde os resultados demonstraram que nas frações em que os valores de flavonóides e ácidos fenólicos eram maiores, existia também uma relevante ação antimicobacteriana (BOLIGON et al., 2012). As folhas *Ficus benjamina* e de *Ficus luschnathiana*, também apresentaram altos teores de compostos fenólicos e flavonoides, da mesma forma que se apresentaram ativas contra cepas de *Mycobacterium M. smegmatise M. tuberculosis* (CRUZ et al., 2012).

3.4.5. Atividade antiparasitária

Os tripanossomas são microrganismos pertencentes ao reino *Protozoa*, filo *Euglenozoa*, subfilo *Sarcomastigophora*, superclasse *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Cinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*. Os que são transmitidos por picadas de vetores biológicos são chamados de Salivaria, e aqueles que a contaminação se dá através da pele ou das mucosas do

hospedeiro são denominados de Stercocaria, (HOARE, 1972; SILVA et al, 2002). *T. evansi* fazem parte da secção Salivaria e são extremamente patogênicos para animais domésticos e seres humanos (CONNOR e VAN DEN BOSSCHE, 2004).

O *T. evansi*, trata-se de um protozoário flagelado que é o agente etiológico da doença “surra” ou “mal das cadeiras”, que acomete cavalos, porém, existem relatos de que este parasita foi encontrado parasitando várias espécies de animais domésticos e animais que causam vários achados patológicos. Os casos podem variar de epidemias agudas com altas taxas de letalidade, para subclínica e / ou doença crônica em animais de população endêmica (SILVA et al., 2002). A infecção por *T. evansi* é amplamente distribuída no Brasil e que acomete diversas espécies de animais domésticos e selvagens, se não tratada, os animais desenvolvem sequelas neurológicas ou morrem.

Os fármacos utilizados para o tratamento tripanossomose eliminam os tripanossomas da circulação sanguínea algumas horas após administração, mas o uso extensivo destes fármacos resulta no surgimento de resistência. Além disso, deixam resíduos metabólicos que são depositados no fígado e rim por um longo período. Contudo, o aceturato de diminazeno é o único fármaco liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006) na terapia a tripanossomose causada pelo *T. evansi* em animais, onde já são descritos um grande número de casos de resistência. Outro fator que dificulta o tratamento é o fato de o *T. evansi* possuir a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ao passo que o aceturato de diminazeno não possui esta propriedade, causando recidivas (BRANDELLI et al, 2009). A dificuldade e o custo elevado do tratamento, resultam na morte dos animais doentes, o que acaba gerando também um problema de grande importância econômica. Por este motivo surge a necessidade da pesquisa de novas alternativas terapêuticas frente a *T. evansi* (BRUN et al, 1998; MAUDLIN et al, 2004).

Algumas plantas medicinais nigerianas, como a *Eugenia uniflora*, também têm sido rastreadas quanto às propriedades anti-tripanosomais e recentemente, Weniger et al. (2001) relataram atividade de plantas colombianas contra várias cepas do *Plasmodium falciparum*, *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*. Levando-se em consideração toda a problemática no tratamento de diversas infecções, com a diminuição da sensibilidade dos microrganismos frente aos fármacos disponíveis atualmente e os altos custos com tratamentos, torna-se relevante à busca por novos compostos com ação antimicrobiana. A magnitude da biodiversidade brasileira instiga a pesquisa por compostos bioativos extraídos de plantas que possam atuar na eliminação ou controle

das infecções microbianas. Os metabólitos secundários, compostos fenólicos e taninos, produzidos pelos vegetais, são os principais alvos dessas pesquisas (ADEWUNMI et al, 2001).

3.5 Biofilmes

Os microrganismos podem se apresentar na forma planctônica em suspensão circulando isoladamente, enquanto que na forma sésil se encontram aderidos a superfícies sob a forma de estruturas complexas. Os biofilmes são o resultado de um ecossistema microbiológico aderido a uma superfície, formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sendo assim, essas estruturas podem ser constituídas por bactérias, fungos e/ou protozoários. A partir da associação entre os microrganismos, ocorre a formação de uma matriz de polímeros orgânicos (KASNOWSKI et al, 2010). Estima-se que mais de 90% dos microrganismos são capazes de viver sob a forma de biofilmes e, em tese, praticamente não existe superfície - seja ela natural ou sintética - que não possa vir a ser colonizada por microrganismos (COSTERTON et al, 1995; HOIBY et al, 2011).

Estima-se que 70% dos microrganismos que causam infecções hospitalares no Brasil são resistentes, pelo menos, a um antimicrobiano e grande parcela de todas as infecções microbianas em humanos estão relacionadas a biofilmes, segundo o Ministério da Saúde. A maioria das infecções envolvendo formação de biofilme está associada a implantes de dispositivos médicos como cateteres e próteses. Além disso, são uma potencial fonte de contaminação em indústrias entupindo tubulações e podendo precipitar a corrosão de equipamentos, trazendo grandes prejuízos para as indústrias e risco à saúde pública (HOEFLER et al, 2012; VASCONCELLOS, 2009; MARCINKIEWICZ, 2013).

A estrutura complexa dos biofilmes está diretamente relacionada com a dificuldade no tratamento das infecções, onde substâncias tóxicas às células microbianas, como por exemplo, os antimicrobianos e antissépticos, enfrentam dificuldades para penetrar no biofilme (VASCONCELLOS, 2009). Dentre os mais reportados, pode-se incluir *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* (SHEN, 2011). O *S. aureus* e o *S. epidermidis* são frequentemente encontradas em cateteres cardiovasculares sendo responsáveis por cerca de 40% a 50%

das infecções relacionadas ao implante desses dispositivos médicos (AGARWAL, 2010).

Comumente as infecções mais graves estão relacionadas com a formação de biofilmes em cateteres intravasculares, tanto a nível superficial da pele no local de inserção, quanto à sepse. Recentemente visando reduzir os riscos de infecções relacionadas ao cateter (CRIs) buscam-se melhorias na antissepsia da pele e uso de cateteres com antimicrobianos (PRATT et al., 2007; CASEY et al., 2008). No entanto, a eficácia de tais medidas é questionável, pois os antissépticos frequentemente utilizados no ambiente hospitalar, além de não erradicarem todos os microrganismos da pele, não atingindo-os nas camadas mais profundas, podem, até mesmo, incentivar a formação de biofilmes quando em baixas concentrações (KARPANEN et al, 2009).

3.5.1 Estrutura e composição dos biofilmes

O biofilme é composto de uma estrutura complexa, formada por um aglomerado de microrganismos de mesma espécie ou espécies diferentes, aderidos a uma superfície e entre si, cobertos por uma camada de exopolissacarídeos. No interior do biofilme os microrganismos possuem grandes benefícios, quando comparados aos seus homólogos de vida livre. Essas vantagens ocorrem devido ao fato dos agregados de microrganismos apresentarem maior disponibilidade de nutrientes, interferindo nas taxas de crescimento, cooperatividade metabólica e proteção aos fatores externos (DAVIES et al, 1998; BEHLAU e GILMORE, 2008).

A estrutura do biofilme é influenciada por vários fatores, os quais incluem as condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade microbiana e comunicação intracelular. A matriz polimérica (EPS) é o material extracelular - constituído por diferentes biopolímeros produzidos pelos próprios microrganismos ao qual o biofilme está incorporado e tem como papel fundamental no desenvolvimento da morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes. Do mesmo modo, sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas, assim como condiciona a vasta gama de vantagens a este modo de vida (FLEMMING e WINGENDER, 2000; FLEMMING, 2001).

A camada de EPS faz parte de 90% da massa seca dos biofilmes e oferece um ambiente protetor às células microbianas, dificultando a penetração de agentes

germicidas, agindo como uma barreira de filtração, gerando uma penetração lenta ou reduzida de agentes antimicrobianos em geral, quer sejam antibióticos ou biocidas. A matriz também protege os microrganismos contra a dessecação, oxidação, radiação ultravioleta e defesa imunitária. Esta forma de organização também favorece a captação de elementos necessários à sobrevivência, porque a sua estrutura permite a circulação de água, oxigênio e nutrientes. Devido à retenção de enzimas extracelulares, um sistema digestivo versátil é gerado, onde os nutrientes são captados e dissolvidos a partir da água existente, permitindo que sejam utilizados como fontes de energia. Assim, os elementos nutritivos presentes nos fluídos circulam e tendem a se depositar neste aglomerado celular (COSTERTON, 1995).

Devido à coagregação que ocorre no interior dos biofilmes, permite fortes interações intercelulares. As células, dentro da estrutura de biofilme, se comunicam entre si por meio de moléculas químicas exibindo, por conseguinte, um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas, esta comunicação célula-célula é denominada de “quorum sensing” (QS), que pode ser entendido como um “sentido de grupo” (DONLAN, 2001). Caracterizado de comunicação química entre os microrganismos o QS é o exemplo responsável por modular diversas funções celulares, incluindo a formação do biofilme, a patogênese, a aquisição de nutrientes, a motilidade e a produção de metabólitos secundários (RENNER, 2011).

No entanto, este comportamento só se manifesta quando os microrganismos atingem uma densidade populacional limite (RAJPARA, 2013). Microrganismos oportunistas, como *P. aeruginosa*, adiam o seu fenótipo virulento até atingirem um determinado tamanho populacional que seja capaz de superar as defesas do hospedeiro (KALIA, 2012). A estrutura do biofilme depende dessa complexa teia de interações simbióticas (LI, 2012).

3.5.2 Formação do biofilme

Inicialmente, há o processo de adesão microbiana, onde ocorre a aproximação do microrganismo à superfície. Nesta etapa estão envolvidas as estruturas de adesão, como, fimbrias e flagelos que estão presentes na superfície celular da maioria de alguns microrganismos, superando as forças de repulsão e facilitando a adesão das células (CARPENTIER e CEREF, 2003). A motilidade pode ser necessária para permitir que o

microrganismo alcance uma determinada superfície e também para que estes se movam dentro do biofilme maduro, fazendo com que haja a propagação e crescimento do mesmo. Entretanto, a motilidade também está envolvida na libertação das células microbianas a partir do biofilme maduro (VERSTRAETEN, 2008).

O processo de adesão primária ainda é reversível, porém, a medida que vai aumentando o acúmulo de nutrientes, as células pioneiras se reproduzem originando microcolônias e a adesão torna-se irreversível. As microcolônias sintetizam substâncias extracelulares que atuam como substrato para a adesão de outros microrganismos, que são chamados colonizadores secundários que podem se aderir diretamente aos primários ou promoverem a formação de co-agregados com outros microrganismos, e então se aderirem aos primários (DONLAN, 2001).

O biofilme torna-se maduro, logo após a fase de co-agregação, quando há um aumento da densidade populacional e deposição de componentes extracelulares gerados pelos microrganismos. Pode-se afirmar que um biofilme maduro caracteriza-se por ser uma estrutura altamente hidratada e viscoelástica, constituindo-se de um aspecto gelatinoso e escorregadio. Por fim, quando o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, a massa microbiana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes causando contaminação (DONLAN, 2001; WATNICK e KOLTER, 2000). A figura 3 ilustra os processos de formação do biofilme.

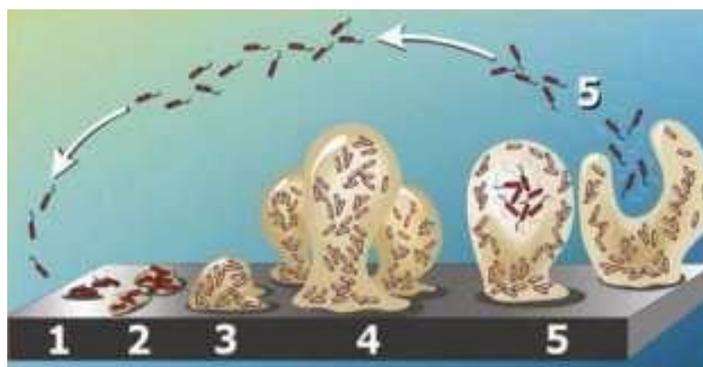


Figura 3- Ciclo de um biofilme. 1) Adesão; 2) Crescimento; 3) Propagação ou Dispersão.(Fonte: Hypertextbooks.shop).

3.5.3 Importância clínica dos biofilmes

Bactérias e fungos na forma de biofilmes apresentam-se mais resistentes aos fármacos antimicrobianos e desinfetantes, dificultando ainda mais o tratamento das infecções. Quando os microrganismos estão aderidos a superfícies em forma de biofilmes, a quantidade para se formar um inoculo é 100 vezes menor e a CIM para microrganismos em biofilme podem ser de até 1000 vezes maior do que quando se apresentam na forma planctônica (DAVIES et al, 1998). Estão descritos na literatura, diversos mecanismos de resistência, que atuam conjuntamente e podem explicar o difícil tratamento das infecções relacionadas com a formação de biofilme. Um dos fatores é a resistência física que o biofilme provoca, as substâncias poliméricas que o constituem, retardam a difusão dos antimicrobianos e desinfetantes, impedindo a penetração destes nas camadas mais profundas. Além disso, os microrganismos poderiam se diferenciar em fenótipos mais resistentes ou a depleção de nutrientes ou acúmulo de resíduos poderia antagonizar os efeitos dos antimicrobianos (STEWART e COSTERTON, 2001).

Na vida em biofilme, as células microbianas estão em contato, o que facilita a troca de informações genéticas e, onde são transferidos genes de resistência de uma célula para outra. Isso ocorre no processo de quorum sensing, onde, uma moléculas sinalizadora, permite que os microrganismos ao atingirem uma concentração limite expressem genes de diferentes fenótipos, essencialmente os que atribuem resitência Há relatos na literatura da influência do QS sobre a virulência de alguns microrganismos quando em biofilme. *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus spp.* são somente alguns exemplos de patógenos que têm sua tolerância aos antimicrobianos associada a este complexo sistema (SUPIGGER et al, 2013; DENG et al, 2013; KONGO et al, 2013).

A formação de biofilme em cateteres intravenoso está presente em 60% dos casos e causa a morte de cerca de 10.000 pacientes. As despesas hospitalares de US\$ 11 bilhões por ano nos Estados Unidos (FINE, 2005). Quando os cateteres são urinários, 20% dos casos de infecção apresentam-se positivas para a formação de biofilme, o que acarreta na dificuldade terapêutica. Além disso, embora menos estabelecido, o biofilme pode estar relacionado a doenças sem associação com implantes, como a fibrose cística. Esta condição se apresenta intimamente relacionada com os microrganismos formadores de biofilme (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Na rotina hospitalar, utiliza-se uma grande quantidade de desinfetantes a fim de eliminar microrganismos tanto da pele humana como de superfícies inanimadas. Porém, devido ao uso indiscriminado e à estrutura complexa dos biofilmes - na maioria das vezes, não são efetivos. Deste modo, muitas estratégias alternativas têm sido estudadas e utilizadas para prevenir a adesão microbiana, retardar a formação de biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação. Atualmente, há um grande número de pesquisas buscando táticas efetivas contra os biofilmes, principalmente no que diz respeito à obtenção de novos produtos que possuam alta atividade antimicrobiana (MARCINKIEWICZ, 2013; MARTINEZ-GUTIERREZA et al, 2013).

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Material Vegetal

O material vegetal usado no estudo foi coletado na cidade de Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brasil) no distrito de São Martinho da Serra, entre setembro e novembro de 2013. A caracterização botânica de *E. hyemale* foi realizada pelo engenheiro ambiental David Lira e a excicata está arquivada no herbário da engenharia ambiental sob o número de registro 6756. As análises foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em parceria com o Centro Universitário Franciscano (UNIFRA).

4.1.2 Substância química de referência

Os padrões utilizados neste estudo foram quercetina (Sigma), ácido pirogálico (Vetec), ácido ascórbico (Sigma), ácido clorogênico (Sigma), ácido rosmarínico (Sigma).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do extrato das hastes do vegetal

As hastes foram submetidas à secagem em estufa (temperatura inferior a 40 °C) com circulação de ar e posteriormente trituradas em moinho de facas. A seguir, o material vegetal foi submetido à maceração hidroalcoólica (EtOH:H₂O 70:30 v/v) a temperatura ambiente pelo período de sete dias com agitação ocasional. O solvente da maceração foi renovado várias vezes para a extração dos compostos presentes nas folhas. Após esse período, o conteúdo filtrado, (extrato hidroalcoólico) foi submetido ao evaporador rotatório à temperatura inferior a 40°C para eliminação do etanol, parte desse resíduo aquoso foi seco em estufa para a obtenção do extrato bruto (SIMÕES, 2010).

4.2.2 Fracionamento dos extratos

Outra parte do remanescente aquoso foi submetida ao fracionamento em ampolas de separação para extração líquido/líquido utilizando os solventes: diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente, em polaridades crescentes, até esgotamento. Por fim, as frações obtidas foram concentradas a securo no evaporador rotatório (Figura 4).

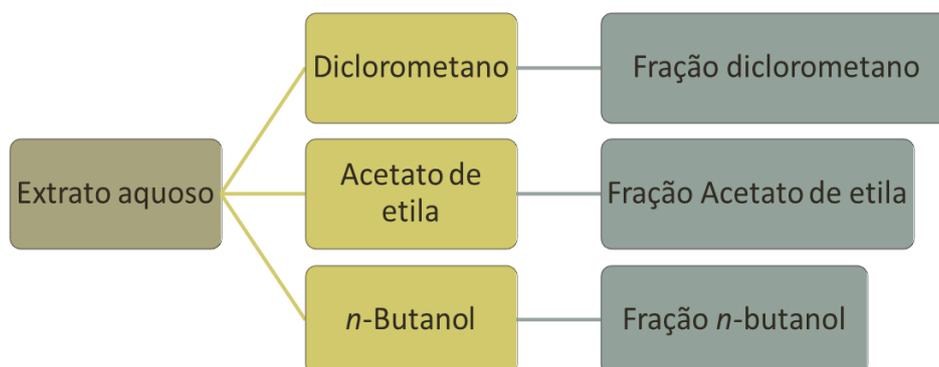


Figura 4- Fluxograma do processo de fracionamento

4.3 Análises fitoquímicas

4.3.1 Doseamento de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais, foi utilizado o método colorimétrico descrito por Chandra e colaboradores (2004), o qual utiliza o reagente Folin-Ciocalteu 2N e leitura em espectrofotômetro à 730 nm. As frações e o extrato bruto foram diluídos em etanol até a concentração final de 0,150 mg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de polifenóis totais calculado pela equação da reta $Y=15,573x + 0,0213$ ($r=0,997$), obtida da curva analítica, utilizando o ácido pirogálico como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de mg de ácido pirogálico (AP)/g de extrato fruto ou fração seca (FS).

4.3.2 Doseamento de flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado seguindo o método descrito por Woisky & Salatino, (1998), o qual utiliza a solução de $AlCl_3$ 2% e leitura em espectrofotômetro à 420 nm. As frações e o extrato bruto foram preparadas na concentração de 1 mg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de flavonoides foi calculado pela equação da reta $Y=4,1562x + 0,0034$ ($r=0,997$), obtida da curva analítica, utilizando quercetina como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de mg de quercetina (Q)/g de fração seca (FS).

4.3.3 Delineamento do perfil cromatográfico por CLAE-DAD

O extrato bruto e as frações foram analisados por CLAE-DAD, em cromatógrafo da marca Shimadzu, composto de bomba, autoinjeter, detector DAD e comunicador, operado com o auxílio de computador com o software LC Solution. A cromatografia de fase reversa foi realizada em coluna Phenomenex C-18 (4,6 mm x 250 mm), utilizando como fase móvel A (ácido acético 2%) e B (metanol), com fluxo 0,8 mL/min e volume de injeção de 40 μ L de acordo com o método de eluição por gradiente de Evaristo e Leitão, (2001) levemente modificado. A presença dos seguintes compostos foi investigada no extrato bruto e frações: ácido pirogálico, ácido gálico, catequina, ácido

clorogênico, ácido cafeico, orientina, vitexina, cumarina, rutina, ácido rosmarínico, 4-hidróxi cumarina, quercetina, luteolina, apigenina, canferol e crisina. A identificação se deu por comparação do tempo de retenção e espectro de absorção UV (230-400nm) dos padrões com a amostra. Para os compostos identificados foi feita preparada curva padrão, para fins de quantificação, na faixa de 2,5 a 60 µg/ml.

4.4 Capacidade antioxidante

4.4.1. Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante foi utilizada a metodologia segundo Choi et al., (2002) onde utiliza-se o princípio colorimétrico do DPPH. Foram avaliadas as frações e o extrato bruto nas concentrações 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata e a porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada através da equação, descrita a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{[(\text{Abs. da amostra} - \text{Abs. do branco}) \times 100]}{\text{Abs. do controle}}$$

Onde:

Abs. da amostra: é a absorbância da fração e do extrato bruto;

Abs. do branco: é a absorbância das frações e do extrato bruto sem adição do DPPH;

Abs. Controle: é a absorbância da solução de DPPH em etanol.

Após ser calculada a inibição do radical DPPH em porcentagem, foi construído um gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração dos extratos utilizados, empregando como padrão o ácido ascórbico.

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

4.5.1 Determinação da CIM para bactérias

A CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços utilizando o meio de cultura caldo Mueller Hinton (Difco). O inóculo foi ajustado à escala 0,5 de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foi adicionado então o extrato bruto e frações de *E. hyemale* na concentração inicial de 100 mg/mL e o ensaio foi realizado em triplicata. Como controle negativo foi utilizado somente o meio de cultura e como controle positivo, meio de cultura mais o inóculo. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e após o tempo de incubação foi aplicada uma substância indicadora de crescimento bacteriano (2,3,5 trifeniltetrazólio) (CLSI, 2013).

4.5.2 Determinação da CIM para espécies de *Candida*

Os testes para avaliar a suscetibilidade dos microrganismos frente ao extrato bruto e frações da *E. hyemale* foram realizadas com base na M27-A3 (CLSI 2010) e M38-A2 (CLSI 2010). A suscetibilidade foi expressa através da CIM utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Todas as soluções de extrato bruto e frações foram diluídas com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 contendo L - glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 mol/L de tampão de MOPS.

4.5.3 Determinação da CIM para espécies de *Mycobacterium*

Foram utilizadas quatro micobactérias de crescimento rápido: *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 (ATCC 700084), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977) e *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898). Além disto, foram utilizadas duas cepas de micobactérias de crescimento lento: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618), *Mycobacterium avium*. Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo usando os protocolos do CLSI M24-A. O

ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo em U em triplicata. Foram realizadas diluições em série da suspensão do extrato bruto e frações de *E. hyemale*. As placas foram incubadas a 35°C por cinco (para micobactérias de crescimento rápido) ou 33°C sete dias (para micobactérias de crescimento lento) em câmara úmida. Os resultados foram observados a olho nu pela formação do pontilhado bacteriano no fundo dos poços.

4.6 Atividade antibiofilme

4.6.1 Ensaio de formação de biofilme

Foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 14053 e *P. aeruginosa* PA01 (formadores de biofilmes) pertencente à bacterioteca/micoteca do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano. As amostras foram inoculadas em ágar *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas e transferidas para caldo BHI. Em seguida, foi adicionado 200 µL de cada suspensão bacteriana ajustada em 0,5 da escala de MacFarland foram inoculados, em triplicata, em poços de placas estéreis de microtitulação de poliestireno de 96 cavidades com fundo plano. Os controles negativos foram poços com caldos BHI em triplicata, não inoculados. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas a fim de se ter a formação de biofilme maduro, e em seguida foi adicionado o extrato bruto e frações da *E. hyemale* nas concentrações de metade do valor do CIM, o próprio valor do CIM e o dobro disso. Após 24h de incubação, a suspensão foi aspirada e cada poço foi lavado 3 vezes com 250 µL de solução fisiológica a 0,9% estéril. Após, foi realizada a fixação do biofilme em estufa a 60°C por 60 minutos. As placas foram coradas com 200µL de solução de cristal violeta de Hucker 1% durante 15 minutos, lavadas 5 vezes com água deionizada e após, foi adicionado 200 µL de Etanol 95% por 10 minutos. Por fim, foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de 34 microplacas em comprimento de onda de 492 nm (RODRIGUES et al, 2009).

4.6.2 Análise qualitativa do biofilme formado coloração de Calcofluor branco

Foram utilizadas lâminas de vidro comuns (lâminas para microscopia PERFECTA com dimensões 26 x 76 mm e espessura 1,0 a 1,2 mm). Foram testadas estirpe de *C. albicans*. Este microrganismo foi inoculado em caldo BHI e incubado em estufa a 37°C. A partir deste crescimento foram realizadas suspensões correspondentes a 0,5 na escala de Mcfarland. Foram adicionados 2 mL desta suspensão em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de caldo Mueller Hinton e a lâmina de vidro nova. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C para a adesão dos microrganismos. Os testes foram realizados em triplicata. Após o período de incubação foram adicionados o extrato bruto e frações da *E. hyemale* nas concentrações da metade da concentração do MIC, a própria concentração do MIC e o dobro dela. Por fim, as amostras foram incubadas por mais 24 horas.

Após a formação do biofilme, a lâmina de vidro foi retirada da placa, fixada com Cetona (P.A.). Após, foi corada com 10 mL de solução 25 mM de Calcofluor Branco à temperatura ambiente durante 1 min conforme descrito por Gonçalves e colaboradores (2006). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com 100 mL de água destilada estéril. Após secagem em temperatura ambiente as lâminas foram visualizadas sob microscopia de fluorescência (luz U.V.). Foram analisados 30 campos de visualização por lâmina em objetivas de 10 e 40x.

4.7 Avaliação da atividade antiparasitária

Os protozoários da espécie *T. evansi*, utilizados no teste, foram originados de um isolado naturalmente infectado, que foi mantido através de criopreservação. O meio de cultura de *T. evansi* foi adaptado de Baltz e colaboradores (1985) e o teste foi realizado seguindo a metodologia segundo Baldissera e colaboradores (2013). O meio de cultura foi preparado com meio essencial mínimo (MEM), sem glutamina (42 mL), glutamina (0,016 g), bicarbonato de sódio (0,088 g), glucose (0,04 g), HEPES ácido livre (0,238 g), solução de aminoácidos não essencial (200 mL), penicilina (1596 mL L-1) e estreptomicina (100 ng mL-1). No dia do teste, 10 mL de MEM foram separados e foram adicionados 10 uL de 50 mM de hipoxantina e 20 uL de 2 mM de 2-mercaptoetanol. Para a separação dos tripanossomas, 200 uL do criopreservado foram

diluídos em meio de cultura completo (200 mL), armazenado e centrifugado a 400 rpm, 21°C durante 10 min. O sobrenadante foi removido e os tripanossomas foram contados em câmara de Neubauer.

Para realização do teste, o meio de cultura contendo o parasita foi distribuído em placas de microtitulação (250 uL) seguido pela adição de 20 uL do extrato bruto e frações de *E. hyemale*, preparados nas concentrações de 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL e 25mg/mL. Foi utilizado um controle positivo (somente com meio) e um controle negativo (aceturato de diminazeno 0,5%), com o mesmo volume (20 mL). A placa foi incubada em estufa numa temperatura de 37°C e para a observação da ação tripanocida dos extratos de *E. hyemale*, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 horas após o início do experimento e o teste foi realizado em triplicata.

4.8 Estatística

Os valores de IC50 e CC50 foram obtidos a partir de regressão linear análise das curvas de concentração-efeito. Os resultados do HPLC-DAD quantificação foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ pelo teste de Tukey. Dados de biofilmes ensaio foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de gama múltipla de Duncan quando foi apropriado. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (SD) e as diferenças eram considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,000$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise fitoquímica

5.1.1 Doseamento de polifenóis totais e flavonoides

O teor de flavonóides totais foi determinado seguindo o método descrito por Woisky & Salatino (1998) e utilizado quercetina como padrão. As hastes da *E. hyemale*

apresentaram altos teores de flavonoides na fração diclorometano ($134,66 \pm 2,46$ mg/g de planta seca). A maior quantidade desse metabólito nessa fração pode ser devido a possível existência de flavonoides metoxilados de acordo com Cechinel Filho & Yunes (1998). Além disso, como os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos, estes também costumam estar presentes nas frações de alta polaridade, como encontrado neste estudo nas frações butanol e acetato de etila. O extrato bruto apresentou o maior teor de polifenóis ($97,76 \pm 0,65$ mg/g), seguido pelas frações acetato de etila, butanol e diclorometano (tabela 1). Estes resultados eram esperados, uma vez que estudos de composição qualitativa de extratos de plantas revelam a presença de altas concentrações de compostos fenólicos nos extratos obtidos, utilizando solventes polares (CANADANOVIC et al, 2008).

A análise desses compostos é influenciada pela sua estrutura química, método de extração empregado, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas (ANTOLOVICH et al, 2002). Diante disso, os doseamentos realizados neste estudo podem ter sofrido interferências conforme descrito anteriormente, o que pode justificar o elevado teor de flavonoides encontrado nas frações diclorometano e n-butanol comparado ao de polifenóis totais, já que o segundo engloba todas as classes de compostos fenólicos.

Tabela 1- Teor de polifenóis e flavonoides no extrato bruto e frações das folhas de *E. hyemale*

mg/g \pm DP		
Fração	Polifenóis	Flavonóides
EB	$97,76 \pm 0,65$	$43,65 \pm 1,24$
DCM	$49,3 \pm 0,74$	$134,66 \pm 2,46$
EA	$79,14 \pm 0,85$	$67,23 \pm 1,53$
NB	$59,52 \pm 0,73$	$86,03 \pm 1,87$

Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão (DP). EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. EA: fração acetato de etila. NB: fração n-butanol.

A presença de compostos fenólicos nas plantas recebe uma atenção especial, pois possuem diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, entre outras. Os flavonoides formam um grande grupo de

polifenóis, abundantes principalmente em plantas terrestres. No vegetal, desempenham o papel de propagação da espécie, atraindo polinizadores, repelindo insetos e impedindo a proliferação de microrganismos nas plantas (BREDEBACH et al, 2011). Esses compostos possuem propriedades redutoras em sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.(BARREIROS et al, 2006, COUTINHO et al, 2009). Jiang e colaboradores (2013) relataram a presença de compostos fenólicos nos extratos etanólicos e metanólicos da *E. hyemale*, nos respectivos valores de 231,65 mg TAE /g e 224,04 mg TAE /g. A espécie *E. arvense* também apresentou altos teores de compostos fenólicos, onde a fração n-butanol apresentou o maior valor (94,4 mg GAE/g).

5.1.3 Identificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD

Diante do teor de flavonóides e polifenóis encontrados neste estudo, motivou-se a realização da identificação e quantificação de compostos fenólicos, quando possível, através da CLAE-DAD. A presença dos seguintes compostos foi investigada no extrato bruto e frações da *E. hyemale*: ácido pirogálico, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, orientina, vitexina, cumarina, rutina, ácido rosmarínico, 4-hidróxi cumarina, quercetina, luteolina, apigenina, canferol e crisina e por comparação dos tempos de retenção foram identificados ácido rosmarínico e ácido clorogênico, que serão, discutidos nos parágrafos a seguir. No extrato bruto da *E. hyemale* observamos um pico majoritário (1) com um TR (tempo de retenção) = 19,17 min. Conforme o valor do TR, o pico, trata-se de um ácido clorogênico, porém quando comparado o gráfico DAD do padrão de ácido clorogênico, não há semelhança com o gráfico da amostra, como demonstrado nas figuras 5 e 6. Sendo assim, podemos afirmar que se trata de um composto que faz parte do grupo dos polifenóis, excluindo a possibilidade de serem os demais padrões testados. Conforme relatado na literatura, já foram identificados diversos compostos fenólicos no gênero *Equisetum*, como por exemplo, a espécie *E. arvense* L. que acumula várias flavonas e flavonóis (BREDEBACH et al, 2001).

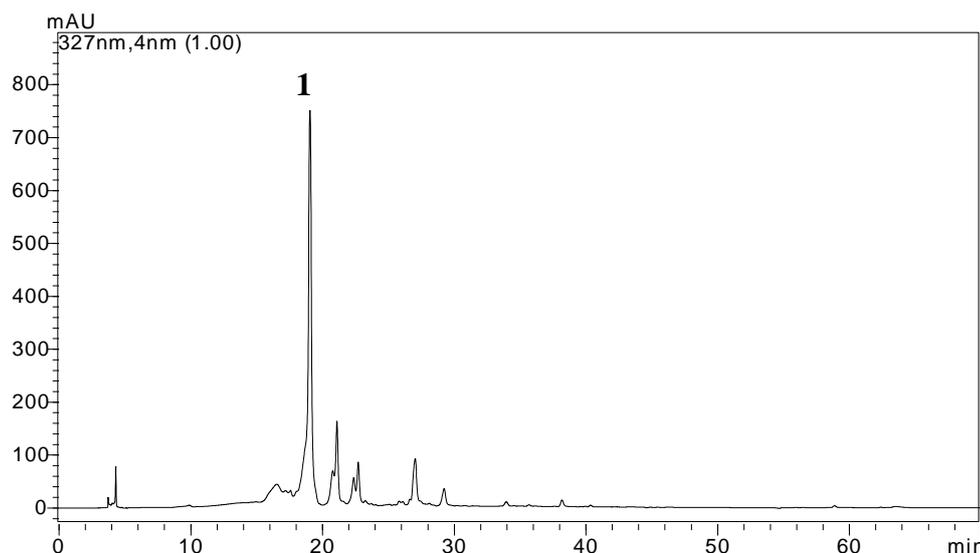


Figura 5- Cromatograma representando no comprimento de onda de 327 nm obtido do extrato bruto de *E.hyemale*. por CLAE/DAD. Picos: 1 – Polifenol não identificado.

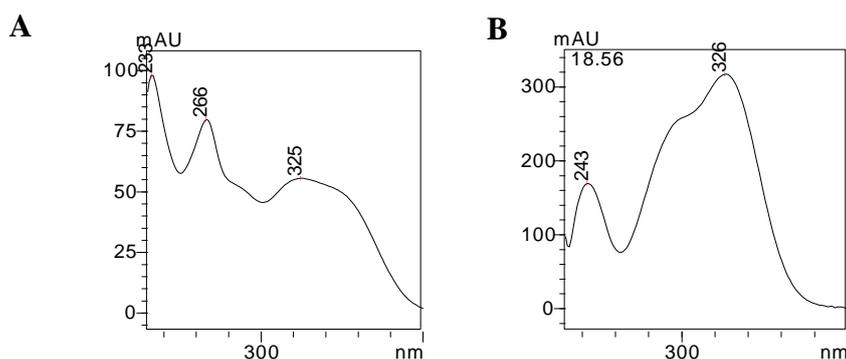


Figura 6- A- Gráfico DAD Espectro de absorção 230-400nm, do pico em 19.17min. B - Gráfico DAD do padrão ácido clorogênico.

Na fração DCM (diclorometano) o pico marcado pelo número, devido ao seu tempo de retenção, trata-se de um polifenol. O pico majoritário, representado com o número 2 possui o mesmo tempo de retenção comparado com vitexina, porém o DAD sugere se tratar de um ácido caféico. Representado pelo número 3 está o pico que apresenta tempo de retenção de 30,89 min, o que indica a presença do composto AR (ácido rosmarínico), como pode ser observado na figura 7. O ácido rosmarínico que conforme descritos na literatura possuem diversas atividades biológicas principalmente antimicrobiana adstringente, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antiviral, o que corrobora com os resultados encontrados em nosso trabalho, onde a fração DCM apresenta potente atividade antimicrobiana e antibiofilme. (FARAH e DONANGELO, 2006).

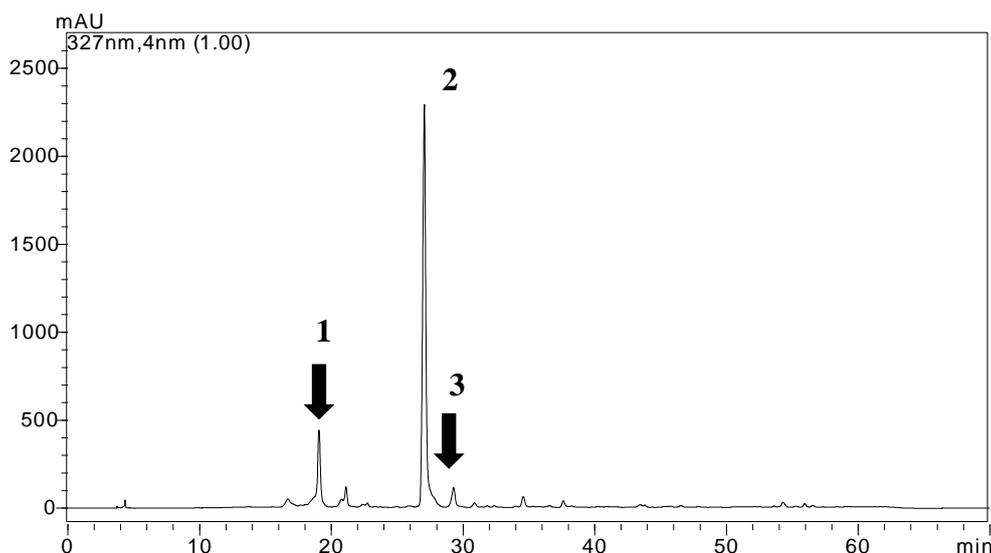


Figura 7- Cromatogramas representados no comprimento de onda de 327 nm, obtido da fração diclorometano (DCM) das hastes de *E. hyemale* por CLAE/DAD. Picos: 1 – polifenol não identificado, 2- Derivados do ácido caféico. 3 – ácido rosmarínico.

O AR, isolado obtido a partir da planta *Rosmarinus officinalis*, (AR), tem sua estrutura elucidada como um éster de ácido cafeico, formado somente por fenilalanina e ácido 3,4-dihidroxifenílico formado por tirosina. A Presença do AR é descrita principalmente nas famílias *Boraginaceae* e *Lamiaceae* e pouco reportada em outras famílias à capacidade de sintetizar e/ou acumular AR evolui bastante no início da filogenia, ou se ele foi desenvolvido de forma independente em diversos táxons. Em relação aos efeitos antioxidantes, o AR está associado principalmente com a eliminação de radicais livres que induz a estabilização da membrana e proteção contra o dano oxidativo (PEREZ-FONS et al, 2010). Na concentração de 135 mg/kg, o AR foi capaz de reduzir fortemente o nível de aspartato aminotransferase no plasma e o nível de expressão de ARNm de TNF- α tanto no fígado quanto no plasma e ainda, inibiu significativamente a sintase do óxido nítrico (iNOS), a expressão de ARNm e estresse oxidativo (OSAKABE et al, 2013).

Além disso, o AR declaradamente reduziu a produção de ROS, o esgotamento de GSH intracelular estimulada por LPS e a regulação positiva de IL-1 β , IL-6, TNF- α , e iNOS (ZDARILOVA et al, 2009). Quanto a atividade antimicrobiana, o AR se mostrou efetivo nas concentrações de 0,3 a 1,3 mg/mL frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* 5001, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus lugdunensis* T26A3, *Enterococcus faecalis* C159-6, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583,

*Corynebacterium*T25-17, *Mycobacterium smegmatis* 5003, e *Staphylococcus warneri*T12A12 (ABEDINI et al. 2013).

Na fração AE podemos observar a presença de um pico representado pelo número 1 não identificado conforme os padrões disponíveis testados. Foi identificado ácido clorogênico (AC) como teor de $8,4 \pm 0,26$ mg/g FS (TR = 19.04 min) (2), O pico representado pelo número 3 devido ao tempo de retenção trata-se de um polifenol, porém não identificado por comparação com os padrões disponíveis testados e o ácido rosmarínico (AR) a concentração encontrada foi de $2,99 \pm 0,06$ mg/g FS (TR =31.00 min) representado pelo pico de número 4, como pode ser observado na figura 8. Na fração NB não foi identificado nenhum dos picos por comparação ao pool de padrões disponíveis.

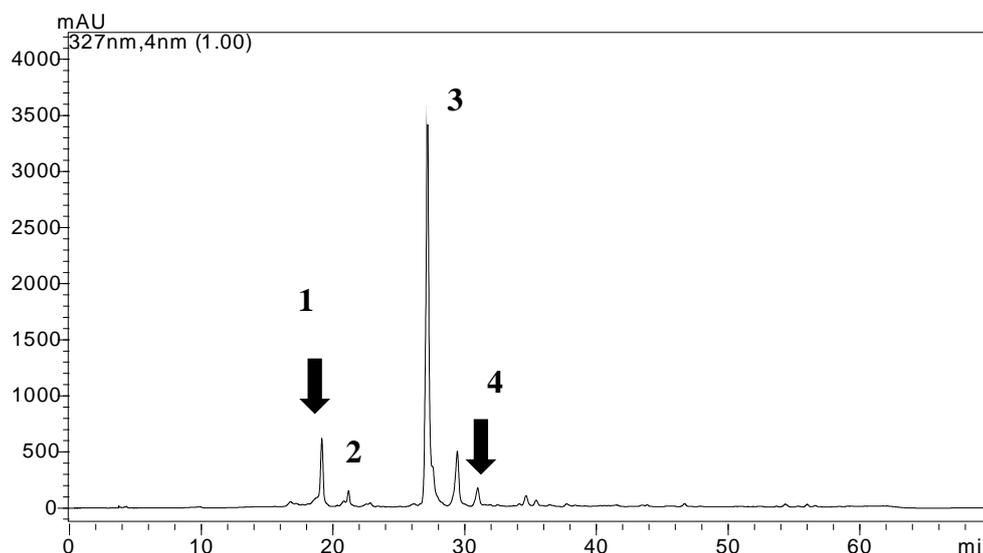


Figura 8- Cromatogramas representados no comprimento de onda de 327 nm, obtido da fração acetato de etila (EA) das folhas de *E. hyemale* por CLAE/DAD. Picos: 1 - não identificado, 2-ácido clorogênico, 3- Polifenol e 4 - ácido rosmarínico.

O ácido clorogênico, é um dos mais abundantes compostos polifenólicos na dieta humana, um éster de que a parte ácida do ácido cafeico é ligado ao grupo hidroxila na posição 5 'do ácido quinico (ácido 5'-cafeoilquínico). Possui efeito frente a células de carcinoma hepatocelular humano (YAN et al, 2015). Outro efeito benéfico do AC é a atividade biológica frente às consequências causadas pela diabetes, tais como: cicatrização de feridas, diminuição dos efeitos oxidativos ocasionados pelo óxido nítrico e glutatona. Existem poucos relatos na literatura quando se trata da atividade antimicrobiana do AC, porém, um teste realizado com cepas de *E. coli* demonstraram

que o AC teve a capacidade de inibir o crescimento bacteriano na concentração mínima de 80 µg/mL (REN et al, 2015; BAGDAS et al, 2015).

Tabela 2- Teor de compostos fenólicos no extrato bruto e frações das folhas de *E. hyemale* por CLAE/DAD.

Extrato bruto e frações	Ácido clorogênico (mg/g FS)	Ácido rosmarínico (mg/g FS)
EB	NI	NI
DCM	NI	7,38 ± 0,08
AE	8,4 ± 0,26	2,99 ± 0,06
NB	NI	NI

Resultados foram obtidos pela média (n=3) ± desvio padrão (DP). NI: não identificado. EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. AE: fração acetato de etila. NB: fração N-butanol.

A composição fenólica dos galhos da espécie *E. giganteum* foi estudada por cromatografia líquida de diodos acoplada à detecção de matriz (LC-DAD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de ionização por electropulverização-tandem (LC-ESI-MS/MS), que identificou derivados do ácido cafeico, flavonoides e polifenóis. Os flavonoides glicosilados mais abundantes nesta amostra foram os derivados do canferol. Além disso, foram identificados também, outros componentes fenólicos como o-3-O-quercetina(cafeoil)-glucoside e 3-3,4-hydroxyhispidin e di-O glicosídeo foram relatados pela primeira vez no gênero *Equisetum*, evidenciando a relação que existe entre as atividades biológicas que o gênero apresenta e seus componentes químico.(FRANCESCATO et al; 2013).

5.2 Capacidade antioxidante

5.2.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH

Os valores de IC₅₀ do extrato bruto e frações de *E. hyemale* no teste da capacidade antioxidante pelo método do DPPH, encontrados nesse estudo, estão apresentados na tabela 3. O IC₅₀ é a concentração necessária para inibir o radical DPPH em 50%, ou seja, aquele composto que apresentar o menor valor, representará a melhor

capacidade sequestradora do radical DPPH. Neste sentido, foi observado que o EB e a fração DCM demonstraram maior capacidade redutora apresentando valores de IC₅₀ 86,55 e 130 µg/mL respectivamente. As frações AE e NB apresentaram capacidades intermediárias, apresentando valores de IC₅₀ 186 e 141,54 µg/mL, respectivamente como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3- Capacidade antioxidante pelo método do DPPH expressos em IC₅₀ do extrato bruto e frações das folhas de *E. hyemale*-

Extrato e frações	IC ₅₀ (µg/mL)
EB	86,55
DCM	130
AE	186
NB	141,54

EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. AE: fração acetato de etila. NB: fração N-butanol

A atividade antioxidante dos vegetais está estreitamente relacionada com a presença de polifenóis e flavonoides. Neste estudo, o extrato bruto e as frações de *E. hyemale* apresentaram uma atividade moderada frente ao radical DPPH. No entanto, análises com outras espécies radicais livres devem ser testadas já que a planta apresentou importante conteúdo de flavonoides e polifenóis (SOUZA et al, 2007). Estudos anteriores, que também avaliaram a atividade antioxidante do gênero *Equisetum* através do método de DPPH, demonstram baixa atividade, porém, quando aplicados outros métodos, verificaram uma alta capacidade isso se deve por que verifica-se diferentes espécies reativas. A literatura sugere que a Cavalinha pode ser utilizada como antioxidante natural, com base nos seus componentes fitoquímicos (BLUMENTHAL et al, 2000).

5.3 Atividade antimicrobiana

5.3.1 Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de *E. hyemale* frente á bactérias.

Através da técnica de microdiluição, partiu-se de uma concentração inicial de 100 mg/mL e utilizou-se como controle negativo de crescimento microbiano o meio de cultura e como controle positivo de crescimento, meio de cultura mais o inóculo. O extrato bruto e as frações das hastas da *E.hyemale* apresentaram-se potentes agentes antimicrobianos frente às dezesseis cepas testadas. No entanto os valores do CIM variaram conforme a fração e cepa testada. As concentrações inibitórias mínimas com valores mais elevados foram observadas no EB e na fração EA, onde os resultados apresentaram inibição de crescimento microbiano na concentração de 52,4 mg/mL frente a maioria das cepas testadas. Contudo, os valores de CIM para as frações DCM e NB variaram entre 26,2 mg/mL e 3,27 mg/mL, o que representa que essas frações são capazes de impedir o crescimento dos microrganismos mesmo se usados em concentrações baixas, como demonstrados na tabela 4.

Tabela 4- Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de *E. hyemale* frente a bactérias.

Microrganismos	CE	DCM	AE	NB
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	52,41	6,5	52,4	3,27
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35985	13,1	3,27	26,2	3,27
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	13,1	3,27	26,2	3,27
<i>S. aureus</i> ATCC 33691	13,1	3,27	13,1	26,2
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina IC	13,1	3,27	26,2	3,27
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	52,4	26,2	52,4	26,2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,1	3,27	26,2	6,55
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	13,1	6,55	26,2	6,55
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022323 ^a	13,1	3,27	26,2	6,55
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13,1	3,27	26,2	26,2
<i>P. aeruginosa</i> PA01	13,1	3,27	26,2	26,2
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705	13,1	3,27	13,1	6,55

EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. AE: fração acetato de etila. NB: fração N-butano.l. IC: isolado clínico.

Um estudo anterior avaliou a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *E.arvense*, onde obtiveram concentrações inibitórias mínimas nos valores de 11,14 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus* e 89,10 mg/ml frente a *Bacillus cereus* (LJILJANA et al, 2013). Recentemente, Queiroz e colaboradores (2015), demonstraram que os extratos etanólicos e metanólicos da *E.hyemale* possuem atividade antimicrobiana, apresentando valores de CIM de 1,25 mg/ml frente á *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Nesse estudo, a potente atividade antimicrobiana foi atribuída á presença de significativos teores de flavonoides encontradas nos mesmos extratos.

Muitos estudos relacionam o acúmulo desses metabólitos secundários nas plantas, com as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-fúngica e anti-inflamatória. Conforme os resultados obtidos em nossos estudos, onde se observou a presença de compostos fenólicos, podemos relacionar esses metabólitos com a atividade antimicrobiana do EB e frações das hastes da *E. hyemale* (KUKRIC et al, 2013; OLIVEIRA et al, 2013; QUEROZ et al, 2015).

5.3.2 Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de *E. hyemale* para espécies de *Candida*

O ensaio foi realizado com base na M27-A3 (CLSI, 2008a) M38-A2 (CLSI, 2008b). Neste estudo, foram observados valores de CIM em 52,4 mg/mL no EB frente a todas as espécies de *Candida*. No entanto, as frações DCM e AE apresentaram CIM de 6,5 mg/mL, um valor quase que oito vezes menor do que o valor encontrado no EB. A fração NB foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos na concentração de 13,1 mg/mL. Os resultados demonstram que tanto o EB quanto as frações, possuem atividade frente às cepas de *Cândida* testadas, com destaque às frações DCM e AE que foram capazes de inibir o crescimento de todas as espécies do fungo, em baixas concentrações.

Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de *E. hyemale* frente a espécies de *Candida*

Microrganismos	EB	DCM	AE	NB
<i>C. albicans</i>	52,4	6,5	6,5	13,1
<i>C. kefyr</i>	52,4	6,5	6,5	13,1
<i>C. geochares</i>	52,4	6,5	6,5	13,1
<i>C. krusei</i>	52,4	6,5	6,5	13,1

EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. AE: fração acetato de etila. NB: fração N-butanol

Frequentemente outras espécies do gênero *Candida* estão sendo relatadas como importantes agentes infecciosos: *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. kefyr*. O aumento na prevalência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* é preocupante, na medida em que essas espécies são mais resistentes aos agentes antifúngicos comumente utilizados (MENEZES et al, 2004; LI et al, 2007).

O extrato aquoso de *E. arvense* se mostrou ativo frente as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. tropicali* e *C. glabrata*, na concentração de 50 mg/mL e para *S. mutans* a CIM foi de 25 mg/ml, corroborando com os resultados encontrados em nossos estudos (OLIVEIRA et al, 2013). As atividades biológicas das plantas, geralmente estão intimamente relacionadas com o a produção de metabolitos secundários. Neste contexto, outros estudos identificaram a presença de compostos fenólicos no gênero *Equisetum*. Essas estruturas têm por função atrair agentes polinizadores e repelir insetos, e são ativos biologicamente contra fungos, bactérias, vírus, além de apresentarem atividade anti-inflamatória e antioxidante (ORHAN et al, 2010).

5.3.3 Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações de *E. hyemale* frente a micobactérias.

O ensaio foi realizado em triplicata, com diluições em série da suspensão do extrato bruto e frações de *E. hyemale*. Os resultados foram observados a olho nu pela formação do pontilhado bacteriano no fundo dos poços. A menor concentração

observada no extrato bruto, foi de 1,25mg/mL frente as cepas de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*. A fração diclorometano foi capaz de inibir o crescimento de *M. smegmatis* e *M. massiliense* na concentração de 0,625mg/ mL, como mostra a tabela 6. É possível relacionar a presença de altos teores de ácido rosmaríco e ácido clorogênico, nas frações DCM e AE, com a suas potentes atividades antimicobacteriana. Nossos resultados evidenciam pela primeira vez a atividade do extrato bruto e frações da *E. hyemale* frente a cepas de micobactérias.

Tabela 6- Concentração inibitória mínima (mg/mL) do extrato bruto e frações da *E. hyemale* frente a cepas de *Mycobacterium*.

Microrganismos	EB	DCM	EA	NB
<i>M. smegmatis</i>	1,25	0,625	0,625	0,625
<i>M. massiliense</i>	2,5	0,625	1,25	1,25
<i>M. abscessos</i>	2,5	1,25	2,5	2,5
<i>M. fortuitum</i>	2,5	1,25	1,25	2,5
<i>M. avium</i>	NI	NI	NI	2,5
<i>M. tuberculosis</i>	1,25	1,25	1,25	1,25

EB: extrato bruto. DCM: fração diclorometano. AE: fração acetato de etila. NB: fração N-butanol

O gênero *Mycobacterium* é composto por bacilos aeróbicos, imóveis, não esporulados e não encapsulados. São também conhecidas como micobactérias “atípicas” ou “micobactérias não tuberculosas” (MNT); são distintas dos agentes etiológicos responsáveis pela tuberculose e pela Hanseníase. Segundo a ANVISA, existe a ocorrência de infecção hospitalar por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* decorrentes de procedimentos invasivo. Esses microrganismos possuem alto teor de lipídios principalmente na parede celular, o que altera a permeabilidade destes microrganismos à água, a soluções corantes utilizados em laboratório e a agentes desinfetantes, dificultado o tratamento (FONTANA, 2008).

5.4 Atividade antibiofilme

5.4.1 Capacidade de inibição de biofilme

A partir dos resultados obtidos na atividade antimicrobiana utilizou-se os mesmos valores das concentrações inibitórias mínimas para realizar-se o ensaio da capacidade de inibição do biofilme, onde valores da metade do CIM, o próprio CIM e o dobro disso foram analisados frente à formação de biofilmes de *C. albicans* ATCC 14053 e *P. aeruginosa* PA01. O extrato bruto foi capaz de inibir a formação de biofilme proporcionalmente às concentrações testadas, tendo em vista que quando testado na concentração de duas vezes o valor do CIM apresentou um percentual de inibição de 70% frente *P. aeruginosa* e de 64% frente a *C. albicans*, como demonstrado na figura 9.

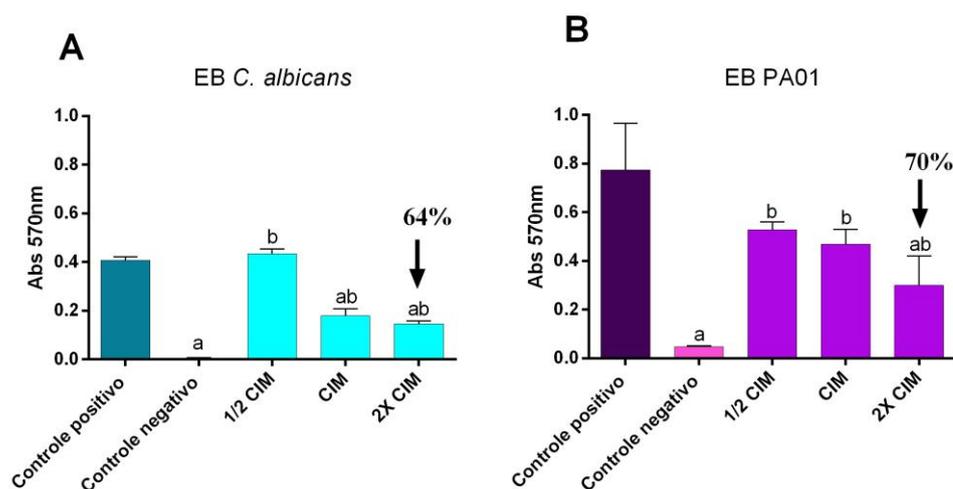


Figura 9- Efeito do extrato bruto da *E. hyemale* sobre a formação de biofilme de *C. albicans* (A) e *P. aeruginosa* (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Erro padrão da média. a-Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo.

Tendo em vista que as plantas medicinais possuem metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, já existem algumas pesquisas que relacionam extratos de plantas com atividade antibiofilme. O extrato hidroalcolico das folhas de *Lippia sidoides* Cham foi testado frente à formação de biofilme dental *in vitro*. As linhagens bacterianas utilizadas na pesquisa foram o *S. mutans*, *S. sanguinis* e o *Lactobacillus*, principais responsáveis pela aderência do biofilme, apresentaram atividade antibiofilme

dental. Os resultados demonstraram que o extrato quando diluído, foi capaz de inibir a aderência de *S. mutans*, sendo comparável à clorexidina (ALBUQUERQUE et al, 2013). Para o gênero *Equisetum*, Wojnicz e colaboradores (2012), determinaram a influência da *E. arvense* e outros gêneros frente a formação de biofilmes de *E. coli*, através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Os resultados obtidos apontaram que todos o extratos testados apresentaram redução significativa na formação de biofilme, nas concentrações de 0,125 mg/mL, com tempos de incubação bacteriana que variam de 4 a 6 dias. Porém, o extrato de *E. arvense* apresentou forte inibição da massa de biofilme após um período de 9 a 10 dias de incubação bacteriana.

As frações diclorometano e acetato de etila foram as que demonstraram maior capacidade de inibição, onde os valores de absorbância foram significativamente menores do que o controle positivo de formação de biofilme. A fração diclorometano, quando testa frente à *C. albicans* na concentração de 2x CIM, foi capaz de inibir em 83% a formação de biofilme e quando testada frente à *P. aeruginosa* na mesma concentração inibiu 51% do crescimento (Figura 10).

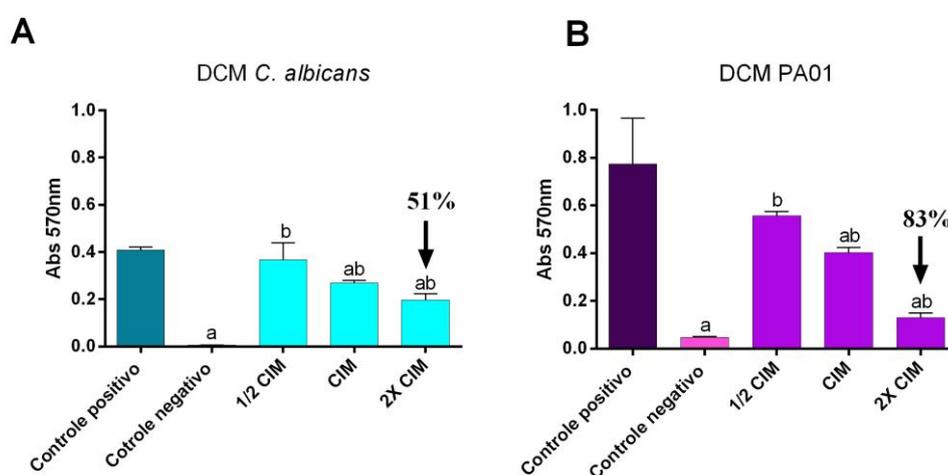


Figura 10- Efeito da fração diclorometano da *E. hyemale*, sobre a formação de biofilme de *C. albicans* (A) e *P. aeruginosa* (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média ± Erro padrão da média). a-Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo.

Nas análises de CLAE-DAD, foi identificada a presença do composto ácido rosmarinico na fração DCM das hastas da *E. hyemale*. Tendo em vista um estudo onde determinou-se a atividade antiaderente do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus*

officinalis Linn. (Alecrim), constituído entre outros compostos pelos ácidos rosmarínico, cafeico e clorogênico, frente às cepas padrão de *S. mitis* ATCC 98811, *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 27609 e *L. casei* ATCC 7469. Demonstraram que o extrato de *R. officinalis* Linn foi efetivo na inibição de aderência de *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* ATCC 27609. (SILVA et al, 2002). Com base nos resultados encontrados em nossos estudos, sugere-se que a atividade antiaderente do ácido rosmarínico, pode estar relacionada em impedir a aderência dos microrganismos, e por consequência também impedir a formação da estrutura do biofilme.

A fração acetato de etila, apresentou percentuais de inibição de 66% e 69 % frente à *P. aeruginosa* e *C. albicans* respectivamente na maior concentração. Frente à *C. albicans* a fração n-butanol, foi capaz de inibir somente 24% do crescimento na maior concentração, porém frente à *P. aeruginosa* o percentual de inibição aumentou 65% na mesma concentração, como demonstrado nas figuras 11 e 12.

Um estudo recente realizado por Ren e colaboradores 2015, observou as taxas de crescimento e morte de *E. coli*, inoculados em superfícies de polidimetilsiloxino (PDMS), revestida com AC extraído da “madressilva”, erva popular chinesa. As superfícies revestidas demonstraram uma forte capacidade para inibir o crescimento celular e uma capacidade moderada para induzir a morte celular. Existem relatos de que o AC quando testado a granel, danifica a membrana das células bacterianas. Quanto à morfologia do microrganismo, mostrou-se uma diminuição dos flagelos, o que leva a suspeitar que o AC possua efeito sobre os polissacarídeos da superfície ou na composição das proteínas de superfícies, impedindo a adesão das bactérias e diminuindo a estabilidade dos biofilmes.

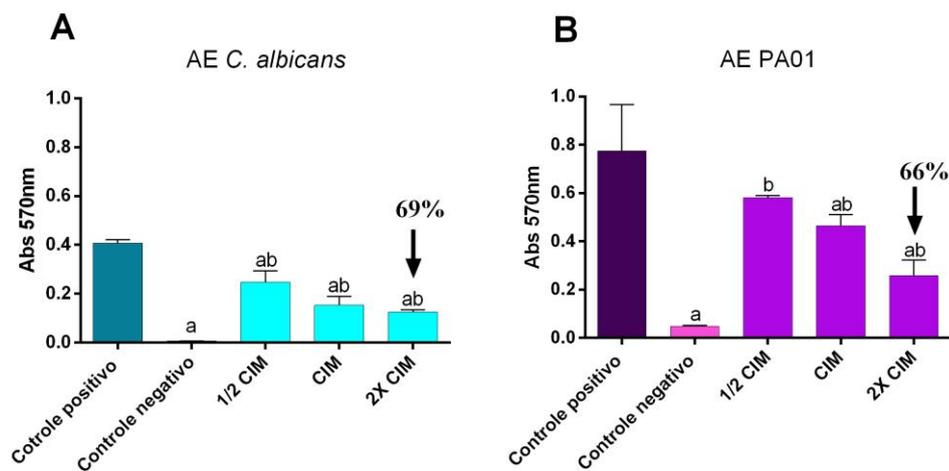


Figura 11- Efeito da fração AE da *E. hymenale* sobre a formação de biofilme de *C. albicans* (A) e *P. aeruginosa* (B). Os valores são expressos como absorbância em 570 nm. (Média \pm Erro padrão da média). a Diferença significativa com relação ao controle negativo. b- Diferença significativa com relação ao controle positivo.

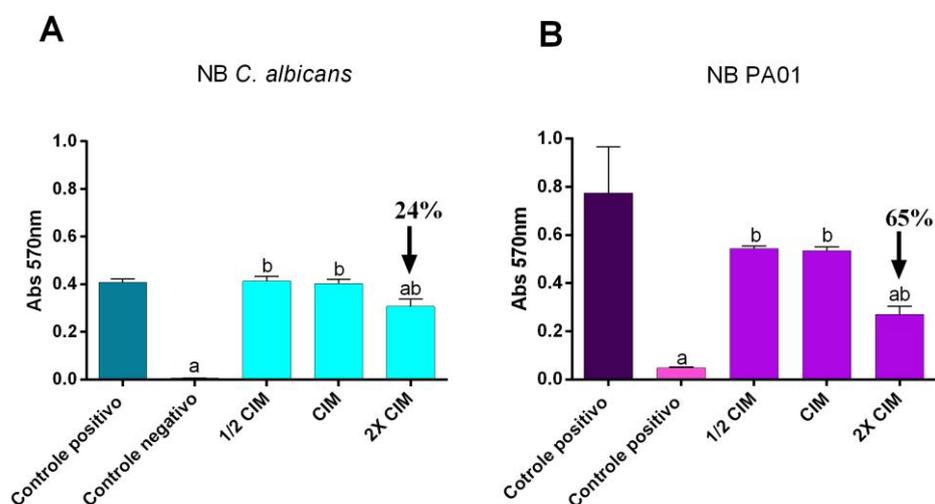


Figura 12- Efeito da fração NB da *E. hymenale*, sobre a formação de biofilme de *C. albicans* (A) e *P. aeruginosa* (B). Os valores são expressos como absorbância em 570nm. (Média \pm Erro padrão da média). a Diferença significativa com relação ao controle negativo. b - Diferença significativa com relação ao controle positivo.

Tendo em vista o potencial farmacológico dos vegetais alguns estudos relatam a capacidade antiaderente de plantas. A Aroeira-do-sertão, Malva e Goiabeira foram testada frente a microrganismos do biofilme dental e candidíase oral, e demonstraram inibição da aderência da bactéria no tubo de vidro (ALVES et al, 2009). Os três extratos

testados, se mostraram capazes de inibir a síntese do glucano pela glicosiltransferase e a assim impedir a aderência dos microrganismos. Wojnicz e colaboradores (2012) determinaram a influência da *E. arvense* frente a formação de biofilmes de *E. coli*, através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Os resultados obtidos apontaram que todos os extratos testados apresentaram redução significativa na formação de biofilme nas concentrações de 0,125 mg/mL com tempos de incubação bacteriana que variam de 4 a 6 dias. Porém, o extrato de *E. arvense* apresentou forte inibição da massa de biofilme após um período de 9 a 10 dias de incubação bacteriana.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi verificada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, pela primeira vez a atividade antibiofilme da *S. buxifolia* frente às cepas de *S. aureus* e *C. albicans*. Ainda, foi identificada através da análise por CLAE a presença dos seguintes compostos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, isoquercitrina, quercitrina e quercetina. Foi possível inferir que a presença destes compostos fenólicos pode estar intimamente relacionada com a atividade antimicrobiana e antibiofilme da espécie, tendo o AC como destaque pela sua relevante atividade antibiofilme quando testado isoladamente. (BOLIGON et al, 2013).

As principais características que influenciam no desenvolvimento do biofilme incluem a aderência e a proliferação (que inclui o desenvolvimento de hifas e formação de tubos germinativos) a produção de matriz extracelular, maturação e a dispersão (RAMAGE et al, 2009). Os resultados encontrados em nossos estudos revelam que a ação do extrato bruto e frações da *E. hyemale* frente a biofilme de *C. albicans* e *P. aeruginosa* pode estar associado a redução da hidrofobicidade das superfícies celular, reduzindo assim a aderência (SUDJANA et al, 2012). Apesar de os vegetais serem amplamente estudados no que se refere à atividade antiaderente e antibiofilme, o nosso estudo descreve pela primeira vez a atividade antibiofilme da espécie *E. hyemale*.

5.4.2 Análise qualitativa do biofilme formado de *C. albicans* coloração de Calcofluor branco

O calcofluor é uma substância que torna a matriz extracelular com composição polissacarídica das leveduras fluorescente. Para a visualização das lâminas coradas com Calcofluor, foi utilizado microscópio de fluorescência com uma câmera acoplada. Esta coloração serviu como metodologia auxiliar para a coloração com cristal violeta, onde

são observadas a redução da massa de biofilme formado por *C. albicans* frente a CIM do extrato bruto e frações da *E. hyemale*. A partir desta coloração, foi gerada a figura 13.

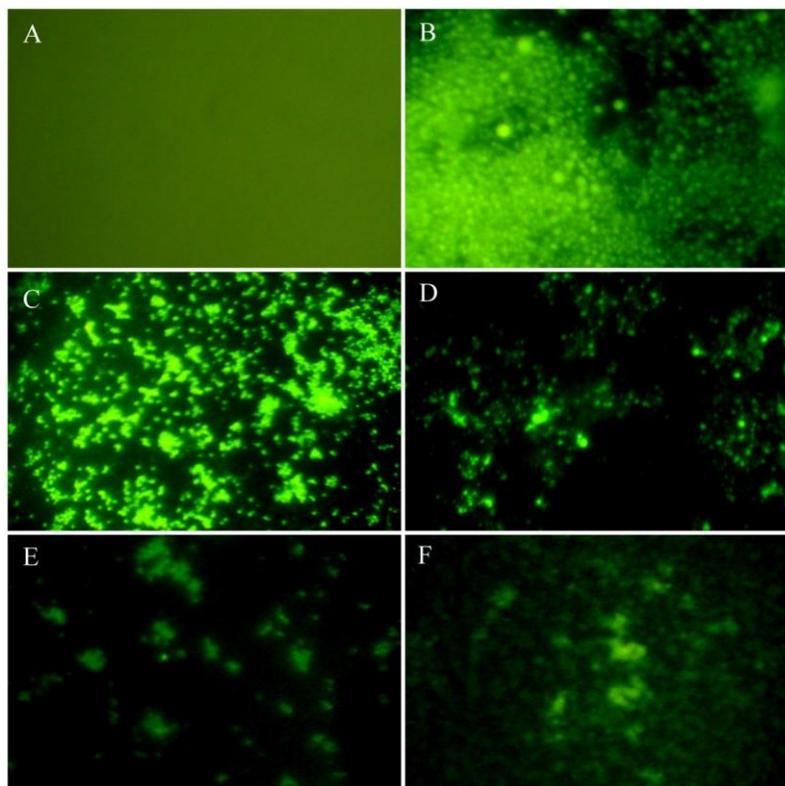


Figura 13- Análise do biofilme formado através da técnica de Calcofluor Branco. As imagens foram obtidas através de microscopia ótica em aumento de 10x. A - Controle negativo: Somente meio de cultivo. B - Controle positivo: meio de cultivo + *C. albicans*. C -Meio de cultivo + *C. albicans* + o EB da *E. hyemale*, na concentração do CIM. D - meio de cultivo + *C. albicans* + fração DCM da *E. hyemale*, na concentração do CIM. E- meio de cultivo + *C. albicans* + fração AE da *E. hyemale* na concentração do CIM. F- meio de cultivo + *C. albicans* + fração NB da *E. hyemale* na concentração do CIM.

As figuras corroboram com os resultados obtidos na quantificação do biofilme formado através da técnica do Cristal Violeta onde as frações DCM e EA apresentaram uma inibição da formação de biofilme formado por *C. albicans* de 83% e 69% respectivamente, na concentração de 2x o valor do CIM. Nessas frações também foram identificados os compostos ácido clorogênico e ácido rosmarínico, são compostos fenólicos que possuem atividades antimicrobiana, adstringente, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antiviral. Por este motivo sugere-se que a significativa capacidade antibiofilme que as frações DCM e AE, estejam intimamente relacionadas com a presença desses compostos fenólicos. (ALBUQUERQUE et al, 2013).

5.5 Atividade antiparasitária

O extrato bruto e frações da *E. hyemale* nas concentrações de 25mg/mL, 12,5mg/mL e 6,25mg/mL foram testados frente a *T. Evansi*. Como controle positivo foi utilizado água (para a diluição do extrato), como controle negativo (acetato de diminazeno 0,5%). Para a observação da ação tripanocida dos compostos os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 horas após o início do experimento, o teste foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos demonstraram que após 9h de exposição, as maiores concentrações do extrato bruto, fração acetato foram capazes de matar 100% dos parasitas, como demonstrados na figura 14 e 15.

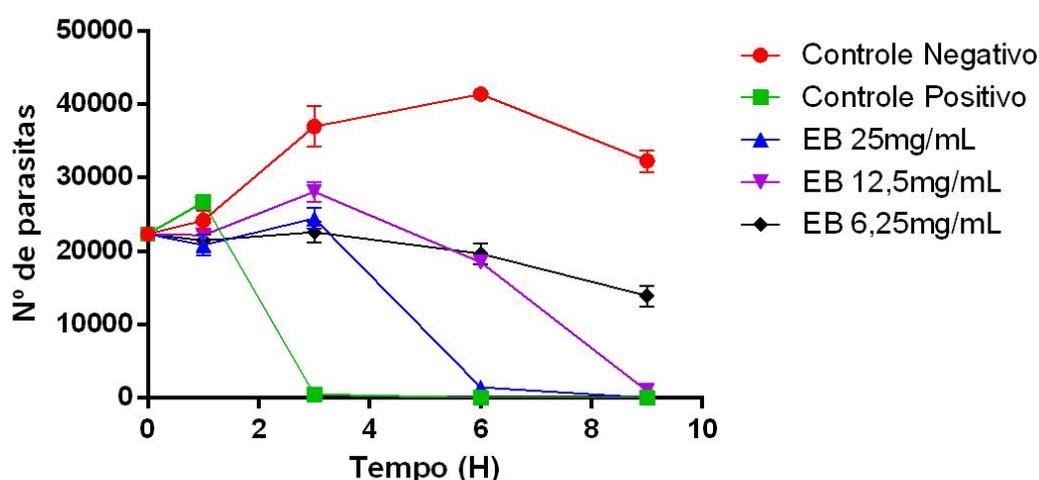


Figura 14- Efeito do extrato bruto da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio

de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoário) como controle positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$), ao mesmo tempo (h).

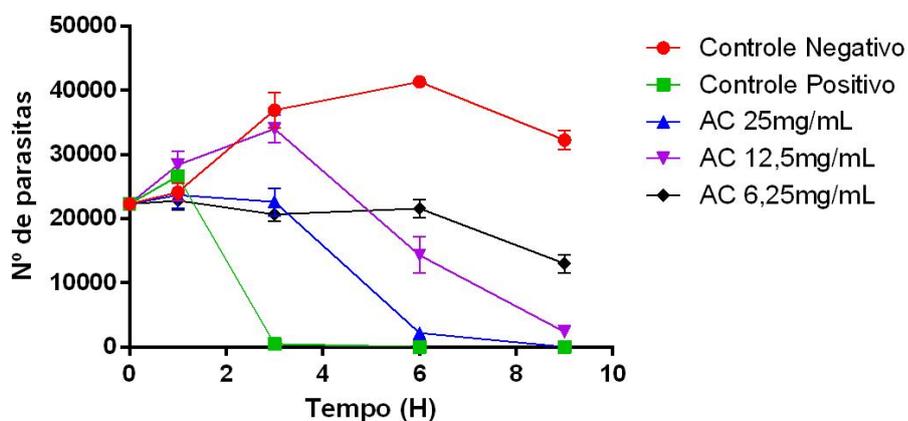


Figura 15- Efeito das frações acetato de etila da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoário) como controle positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h).

Na fração diclorometano, após 9h de exposição, 76,35% dos parasitas foram eliminados frente à concentração mais alta do extrato. Pode-se observar que houve uma redução na morte dos parasitas, conforme diminuam-se as concentrações de extrato e o tempo de exposição, comparados com o aceturato. A fração N-butanol foi capaz de eliminar 100% dos parasitas após 9h de exposição na concentração de 25mg/ml. Com base nos resultados, podemos sugerir que o extrato bruto e as frações da *E. hyemale*, apresentam efeito tripanocidas, como pode ser demonstrado nas figuras 16 e 17.

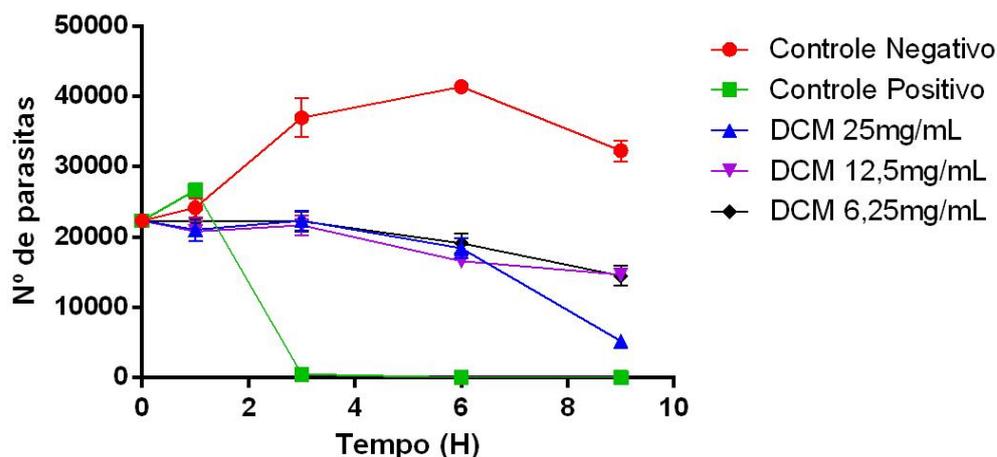


Figura 16- fração diclorometano da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura , foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h).

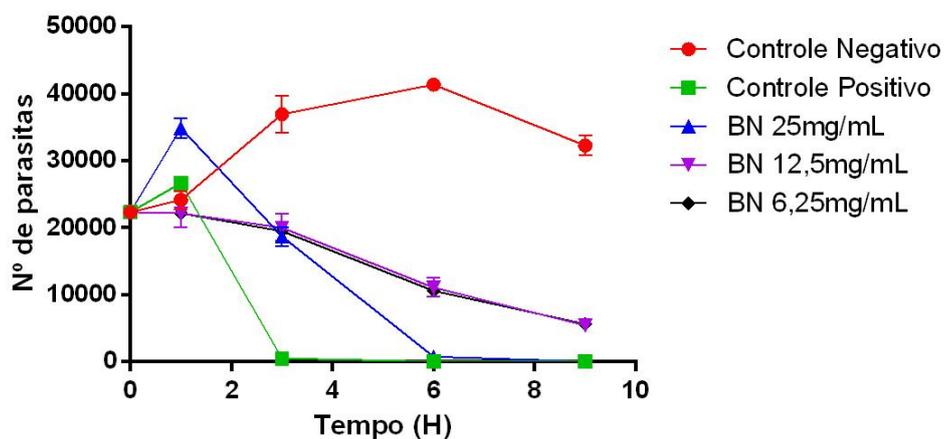


Figura 17- Efeito das frações n-butanol da *E. hyemale*, frente a *Trypanosoma evansi* nas concentrações de 25mg/ml , 12,5mg/ml e 6,25 mg/ml, nos tempos de 0,1,3,6,9 horas de exposição. O tripanossoma e meio de cultura, foram utilizados como controle negativo de crescimento e Aceturato (antiprotozoario) como contole positivo. Os resultados (média e o erro padrão) dentro de um círculo não são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ao mesmo tempo (h).

Tendo em vista a problemática que envolve o tratamento e infecções causadas pelo *T. evansi*, pesquisas que buscam investiga compostos naturais com atividade anti-tripanosomal, são pouco frequentes, A atividade tripanocida dos extratos aquoso,

metanólico e etanólico de *Achrolynes Satureioiddoes*, planta conhecida popularmente como macela e bastante utilizada na medicina caseira como digestivo, anti-inflamatório, dentre outros, foi determinada e os resultados obtidos, demonstraram que os extratos foram capazes de matar todas as tripomastigotas após 1 h, porém, quando o tempo de exposição foi aumentado até 9 horas, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml os 3 extratos foram capazes de eliminar 100% dos parasitas. As atividades dos extratos foram relacionadas com a análise química da *A. Satureioiddoes*, onde se evidenciou a presença de flavonoides, um composto que possui diversas atividades biológicas e dentre elas a tripanocida (BALDISSERA et al, 2014).

A atividade tripanocida do extrato bruto e frações da *E. hyemale*, foi avaliada pela primeira vez em nossos estudos, todas as frações foram capazes de eliminar os parasitas. Porém a atividade tripanocida foi mais potente no extrato bruto, fração acetato e N-butanol, com base nos resultados fitoquímicos, a *E. hyemale* apresenta altos teores de compostos fenólicos em sua composição. Esses compostos possuem diversas atividades biológicas e estão presentes na maioria das plantas, muitas agem em sinergismo com outros compostos e isso pode variar de uma fração para outra, o que explica os melhores resultados para as frações citadas (BRANDELLI et al, 2009 e RETTA et al, 2012).

6 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e analisando-se os resultados obtidos, é possível obter algumas conclusões em relação ao estudo realizado:

- Os ensaios fitoquímicos preliminares, demonstraram a presença de compostos fenólicos no extrato bruto (EB) e nas frações da *E. hyemale* ;

- A capacidade da *E. hyemale*, reduzir radicais livres, foi alto nas frações diclorometano (DCM) e extrato bruto e intermediária para as frações acetato de etila(AE) e n- butanol (NB);

- Através da técnica de CLAE –EAD , foi possível detectar a presença dos compostos, ácido clorogénico em maior quantidade na fração EA, e ácido rosmarínico em maior quantidade na fração DCM;

- O extrato bruto e as frações mostraram-se potentes agentes antimicrobianos. Capazes de inibir o crescimento de bactérias altamente patogênicas. Destacando as frações DCM, que em uma concentração de 3,27 mg/ml, foi capaz de inibir o crescimento de *S. epidermidis* ATCC35985, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *S. aureus* ATCC 33691, *S. aureus* Resistente a Meticilina, *E. coli* ATCC 25922, *S. flexneri* ATCC 12022323A, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 01, *K. pneumoniae* ATCC 1705;

- Quando testados frente à espécies de *Candida*, as frações DCM e AE foram as que apresentaram as menores concentrações mínimas capazes de inibir o crescimento das leveduras;

- Para as espécies de *Mycobacterium*, todos os extratos apresentaram atividade antimycobacterium, tendo as frações DCM e AE como as mais potentes;

- Tanto o extrato bruto quanto as frações, foram capazes de inibir a formação de biofilme, em todos as concentrações testadas, frente aos microrganismos *C. albicans* e *P. aeruginosa* PA01. Porém, na concentração de duas vezes o valor do CIM os melhores resultados se mostraram nas frações DCM e EA;

- Corroborando com os resultados quantitativos, a técnica de calcofluor, demonstrou através de imagens que as frações DCM e EA apresentaram a maior capacidade de reduzir a formação de biofilme;

- Para os testes realizados frente ao parasita *T. evansi*, demonstram que as frações DCM, AE e NB, foram capazes de eliminar totalmente o parasita após 9h de exposição;

- Em todas as atividades biológicas realizadas neste trabalho, foi possível observar que as frações DCM e EA se destacaram por serem capazes de inibir o

crescimento dos microrganismos mesmo em baixas concentrações. As mesmas frações apresentam em sua composição AR e AC.

Os resultados obtidos neste trabalho serão publicados em forma de artigo científico em periódico de impacto na área abordada. Dando seguimento à pesquisa, os compostos identificados neste estudo serão isolados e com eles serão realizados com testes de toxicidade.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI A, ROUMY V, MAHIEUX S, BIABIANY M, STANDAERT-VITSE A, RIVIERE C, SAHPAZ S, BAILLEUL F, NEUT C, HENNEBELLE T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (*Lamiaceae*). *Evid Based Complement Alternat Med.* p 604536, 2013.

ADEWUNMI, C.O. et al. Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, p.19-24, 2001.

AGARWAL S, KULKARNI GT, SHARMA VN A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. *Free Radic Antioxid* v1,p 62–68, 2011.

ALBUQUERQUE A.C.L.,PEREIRA M.S.V., SILVA D.F., PEREIRA L.F.,VIANA F.A.C., HIGINO J.S.,BARBOSA M.R.V. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham. Extract against microorganisms of dental biofilm. *Revista brasileira de plantas medicinais.* v.15, p.41-46, 2013.

ALVES.P. M, QUEIROZ.G.M.L, PEREIRA.V.J E PEREIRA.V.S.M. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v 42, p 222-224, 2009.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.,ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, p. 183 – 198,2002.

ANVISA. Boletim informativo - Fitoterápicos. Edição n. 64, p. 6-8, novembro de 2006.

BAGDAS.D, ETOZ.C.B, GUL.Z, ZIYANOK.S, INAN.S,TURACOZEN.O, GULF.Y.N, TOPAL.A, CINKILICD.N, MUSA.T.S, OZYIGITE.O, GURUN.S.M,. In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: Wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile. v81 p 54–61.2015.

BARREIRA, J. C. M. et al. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1106 - 1113, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113 - 123, 2006.

BECKE-SAGUE C.M., JARVIS W.R., and The National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular Trends in The Epidemiology of Nosocomial Infections in The Unit States, 1980-1990. *Journal Infectious Diseases.* v167, p1247-1251, 1993.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Archives Ophthalmology.*v.126, n.11, p.1572-1581, 2008

- BENETT, R. N., WALSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p. 617 - 633, 1994.
- BALDISSERA.M.D, OLIVEIRA.B.C, ZIMMERMANN.P.E.C, BOLIGON.A.A, ATHAYDE.L.M, BOLZAN.P.L, VAUCHER.A.R, SANTURIO.M.J, SAGRILLO.R.M, SILVA.S.A, MONTEIRO.G.S. In Vitro Trypanocidal Activity of Macela (*Achyrocline satureioides*) Extracts against *Trypanosoma evansi*. **Korean J Parasitol**. V 52, p 311-315, 2014.
- BALTZ T, BALTZ D, GIROUD C, CROCKETT J. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **EMBO J**.v 4, p 1273-1277, 1985.
- BOLIGON A.A, AGERTT V, JANOVIK V, CRUZ R.C, CAMPOS M.M.A, GUILLAUME D, ATHAYDE M.L, DOS SANTOS A.R.S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Brazilian J Pharmacog**. v 22, p 45-52, 2012.
- BOLIGON,A.A.;KUBIC,T.F.;MARIO,D.N.;BRUM,T.F.;PIANA,M.;WEIBLEN,R.;LO VATO,L.;ALVES,S.H.;SANTOS,R.C.V.;ALVES,C.F.S.;ATHAYDE,M.L.Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiol Plant**. v 35 p 2229-2239, 2013.
- BRANDELLI C.LC, GIORDANI RB, DE CARLI GA, TASCA T. Indigenous traditional medicine:in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitol Res**;v104, p 1345-1349, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, June 1995.
- BREDEBACH. M, MATERN.U, MARTENS.S. Three 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activities of *Equisetum arvense* L. forming flavone and flavonol from (2S)-naringenin. **Phytochemistry**. 72 557-563.2011.
- BRUN R, HECKER H, LUN Z. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet Parasitol** v79, p 95-107, 1998.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Mc Graw Hill, v.11, 11ª edição, p.983-997, 2006.
- BUTLER, M, S. The role of natural product chemistry in drug discovery *Journal of Natural Products*. v 67, p 2141-2153, 2004.
- BLUMENTHAL M, GOLDBERG A, BRINCKMANN J: Herbal medicine: expanded commission e monographs. In: Integrative Medicine Communications, 1st Ed. Newton, MA, 2000.
- CANADANOVIC, B.J., CETKOVIC, G., DILAS, S., et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 133-143, 2008.

- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**. v.75, p. 499-511, 2003.
- CASEY, A.L.; MERMEL, L.A.; NIGHTINGALE, P.; et al. Antimicrobial central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 8 p. 763-76, 2008.
- CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação Estrutural para otimização da atividade. **Química. Nova**, v. 21 n. 1, p. 99 - 105, 1998.
- CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguaiensis*) and Green (*Camellia sinensis*) **Teas. J Agric Food Chem**. v.52, p. 3583-3589, 2004.
- CHANG, H, M; BUT P.P. Phamacology and application of Chinese material medica. **Singapore, world scientific**. v 1, 1987.
- CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**. v.163, p. 1161-1168, 2002.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, ninth ed. Approved standard M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- COMALADA, M., BALLESTER, I., BAILON, E. et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. **Biochemical pharmacology**. v. 72, p. 2010 – 1021, 2006.
- CONNOR, R. J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds.). *Infectious diseases of livestock*. 2 ed. South Africa: **Oxford University Press**, v. 1, cap. 12, p. 251 – 296, 2004.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; et al. Microbial Biofilms. **Annu. Rev. MicrobioL**. v.49 p. 711-45, 1995
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F., COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**.v. 1, n. 3, p. 241 - 256, 2009.
- CRUZ C.R, AGERTT V, BOLIGON A.A, JANOVIK V, CAMPOS A.M.M, GUILLAUME D, ATHAYDE L. M.. In vitro antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina L.* and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. Leaves. **Natural Product Research** V 26, N 23, p 2251–2254, 2012.

DENG, Y. et al. Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with quorum sensing systems and T3SS. **BMC Microbiology**. v. 13, p. 1-11, 2013.

CUENCA-ESTRELLA. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances [Rev Esp Quimioter.](#) v4 v169-76, 2010.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. v. 280 p. 295-257, 1998.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. *Campinas*, p. 10, 1996.

DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Health care Epidemiology**. v. 33 p.1387-1392, 2001.

EDMOND M.B., WALLACE S.E., MCCLISH D.K., PHALLER M.A., JONES R.N., WENZEL R.P. Nosocomial Blood stream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v 29, p239-244, 1999.

ELVIN-LEWIS, memory. Should we be concerned about herbal mediciais? **Journal of Ethnopharmacology**. v 75, p 141-164, 2001.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*. v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FARAH, A., & DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v18, p 23–36, 2006.

FINE, D. Advancing oral health through industry/academic partnerships. *UMDNJ-New Jersey. Dental School*.v. 6 p. 7-8, 2005.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. **Water Sci Technol**. v. 43 n. 6 p. 1-8, 2000.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. **WaterSciTechnol**. v. 43 n. 6 p. 1-8, 2001.

FONTANA.R.T. The Mycobacterias of Rapid Growth and the hospital infection: a public health problem *Las Micobacterias de Crescimento Rapido y la infección hospitalaria: un problema de salud publica*. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v 61p 371-6, 2008.

FRANCESCATO,L.N.;DEBENEDETTI,S.L.;SCHWANZ,T.G.;BASSANI,V.L.;HENRIQUES,A.T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by

LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**. v105, p 192-203, 2013.

FROST, T.S; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. *Nature reviews Microbiology*, v3, p. 722-732, 2005.

GARCIA. D, RAMOS.J.A, SANCHIS.V, MARÍN.S. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. v153, p 21–27, 2012.

GARNETT, J.A AND MATTHEWS, S Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural Perspective. *Current Protein and Peptide Science*. v13,p739-755, 2013.

GRIFFITH, D.E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.175, n.4,p.367-416, 2007.

GUERRA, M. P., NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALLAZZO DE-MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis, 2ª ed., Ed Universidade –UFRGS, Ed. UFSC, cap 1, p. 13-28. 2003.

GUIMARÃES, F.M. Botânica. **Morfologia Externa das Plantas**, (Organografia). Nobel. ed 15º São Paulo, p. 112 – 119, 1983.

GUIMARÃES.O.D, MOMESSO.S.L PUPO.T.M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**,Vol.v33,p 667-679, 2010..

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, n. 2 - 3 p. 202 - 267, 2002.

HILGERT N.I. **J. Ethnopharmacol**. v76, p 11–34, 2001.

HIRATA, L. L. et al. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 418 - 424, 2004.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Oxford: Blackwell**. v. 13, p. 749, 1972.

HOEFLER, R.; MENEZES, E.S.; VIDOTTI, C.S.F.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. *Boletim Farmacoterapêutica* • n.4 , 2006.Disponível em:<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/13/farmacoterapeutica.pdf> > acesso em 15 de nov. 2012.

HOHLFELD, M.; VEIT, M.; STRACK, D. Hydroxycinnamoyltransferases involved in the accumulation of caffeic acid esters in gametophytes and sporophytes of *Equisetum arvense*. **Plant Physiol.** v111, p1153–1159, 1996.

HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, K.H.; et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **Int J Oral Sc.** v.3 p. 55-65, 2011.

HOLZHUTER, G.K.; NARAYANAN, T.; GERBER. Structure of sílica in *Equisetum arvense*. **Bioanal Chem.** p. 512-517, 2003.

JHIANG L C et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago species*. **Planta Med** ;v 69:p600–604, 2013.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** n. 15, 2010.

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances.** v. 31, p. 224-245, 2013.

KARPANEN, T.J.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, A.C.; et al. Human Skin and Aqueous Solutions within Excised. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.53 n.4 p. 1717, 2009

KONG, K-F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology.** v. 196, p. 133-139, 2013.

KHAN, M. R et al. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinesis*. **Fitoterapia.** v 72, n 7, p. 825-828, 2001.

KUKRIĆ, Z.; TRIVUNOVIĆ, L.T.; PAVIČIĆ, S.; ŽABIĆ, M.; MATOŠ, S.; DAVIDOVIĆ, A. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense*. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly.** v19 (1) p37–43, 2013.

LAWRENCE, D. and BETTY, H. Quantitative assay of glycocalyx produced by Viridans group *Streptococci* that cause Endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology.** v.27, n.9, p.2039-2041, 1989.

LEBKUECHER, J. G. Desiccation-time limits of photosynthetic recovery in equisetum hyemale (equisetaceae) spores. **American Journal of Botany.** v84, p 792-797, 1997.

LI L.; REDDING S.; DONGARI-BAGTZOGLOU A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **J Dent Res.** v.86 n.3 p.204-15, 2007

LI, H.; HAO, Z.; WANG, X.; HUANG, L.; LI, J. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. **Bioresource Technology.** v. 100, p. 970–974, 2009.

- LI, X; YAN, Z; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. V.149, n.2, p. 353-362, 2003.
- LI,H.; WANG,P.; LIU,Q.; CHENG,X.; ZHOU,Y.; XIAO,Y. Cell cycle arrest and cell apoptosis induced by *Equisetum hyemale* extract in murine leukemia L1210 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. V 144 p322-327 . 2012.
- LINEU, C. *Passiflora*. v.2, p. 955-960.1753
- LJILJANA. K.Z., SVETLANA T-T., ŽABIĆ P.M., MATOŠ S., DAVIDOVIĆ.A. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *equisetum arvense*. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**.v19,p37-43, 2013..
- LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. São Paulo, 2002.
- LU.Y, HUANG.J, LI.Y, MA.T, SANG.P, WANG.W, GAO.B.C. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus*Turcz. root at different harvest times. v183, p 91-100, 2015.
- MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v21, p 361-370, 2000.
- MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**. v. 29, n. 6, p. 651-60, 2013.
- MARCINKIEWICZ, J.; STRUS,M.; PASICH,E. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Pol Arch Med Wewn**. v 6 , p 309-313, 2013.
- MARTIN G.S., MANNINO D.M., EATON S., MOSS M. The Epidemiology of Sepsis in The United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine** v348, p1546-1554, 2003.
- MERRITT, J.H., KADOURI, D.E., O'TOOLE, G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms.**Curr.Protoc.Microbiol**. v. 22 un. 1B.1.1-1B.1.18, 2011.
- MIGUEL, M. D., MIGUEL, G. O. Desenvolvimento de fitoterápicos. **São Paulo: Robe**, 1999.
- MILLISPAUGH,C.F.; Medicinal plants. v 2, p 179, 1892.
- MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v21, p 361-370, 2000.
- MORABITO, F., CRISTANI, M., SAIJA, A., STELITANO, C., CALLEA, V., TOMAINO, A., MINCIULLO, P.L., GANGEMI, S. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by *Hodgkin's lymphoma*. **Mediat. Inflamm.**,v13, p381-383, 2004.
- MORRISON, I.M. et al. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. **Annals of Botany**. v.76, p. 287-290, 1995.

- MOSMANN T .Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** v 65, p55–63, 1983.
- NIKLAS K.J Safety factors in vertical stems—evidence from *Equisetum hyemale*. *Evolution*. v43, p 1625–1636, 1989.
- O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R.Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**. v. 30 n. 2 p. 295–304, 1998.
- OH, H.; KIM, D.H.; CHO, J.H.; KIM, Y.C. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. **J.Ethnopharmacol**.v 95,p 421–424, 2004.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**., v95, p351–358, 1979.
- OLIVEIRA,J.;CASTRO,C.V.;VILELA,G.P.F.;ESTEVEZ,S.;CAMARGO,AA.;CARVALHO,T.C.A.;JORGE,C.O.A AND OLIVEIRA,D.L. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry **BMC Complementary and Alternative Medicine**.v 13,p 208, 2013.
- ORHAN, D.D.; OZÇELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiol. Res**.v165,p 496–504, 2010.
- OSAKABE N, YASUDA A, NATSUME M, SANBONGI C, KATO Y, OSAWA T, YOSHIKAWA T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. **Free Radic Biol Med**.v 33, p 798–806, 2013.
- PARK, E.Y; JEON,H. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Equisetum hyemale*. **Natural product sciences**.v 14, p 239-243, 2008.
- PEREZ-FONS L, GARZON MT, MICOL V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) polyphenols on membrane phospholipid order. **J Agric Food Chem**. v58, p 161–171, 2010.
- PINTO, E. P.P; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais da mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Revista Acta Botânica Brasileira**. v.20, n.4, p.751-762, 2006.
- PRATT, R.J.; PELLOWE, C.M.; WILSON, J.A.; et al. epic2: National evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. **J Hosp Infect**; v. 65 n. 1 p. 61–64, 2007.
- QUEIROZ.G.M.,POLITI F.A.S., RODRIGUES E.R., MOREIRA T. M. S, MOREIRA R.R.D.,CARDOSO.C.R.P.,SANTOS L.C. e PIETRO R.C.L.R.. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale*L. (*Equisetaceae*) Extracts. **Journal of medicinal food**. v18 p 830–834, 2015

- RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G. E PALIĆ, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **Phytotherapy Research**. v.20, p. 85–88, 2006.
- RAMAGE, G; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C. LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Ver Microbiol**. v.35, p.340-355, 2009.
- RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin**. v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.
- RETTA D., DELLACASSA E., VILLAMIL J., SUÁREZ A.S., BANDONI A,L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Ind Crop Prod**; v 38,p 27-38 2012.
- REUTER, C.; GARCIA, S.C. **Protocolo de Fitoterapia na Hipertensão Arterial Sistêmica dos Municípios da BP3**, 2010.
- RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *SalmonellaHeidelberg* isoladas de abatedoura avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37 n.3 p. 225-230, 2009.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.
- ROMERO.D.C, FONTENELLE.S, BUCCK.G.C, MARTINEZ.E, GARCIA.M, BIXBY.L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **Journal of Ethnopharmacology**. v99, p 253–257, 2005.
- SANTOS, I. S. N. Avaliação antioxidante dos compostos fenólicos de extracto de planta da flora portuguesa. (Licenciado), Universidade Fernando Pessoa/Faculdade de Ciências da Saúde (Porto), 2011.
- SAPEI L., NÖSKE R., STRAUCH. P, AND PARIS.O. Isolation of Mesoporous Biogenic Silica from the Perennial Plant *Equisetum hyemale*. **Chemycal. Mater.**, v 20, n 5, p 2020–2025, 2007.
- SUPPIGER, A. et al. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Virulence**. v. 4, n. 5, p. 400-409, 2013.
- SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M.; et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine against Bacteria in Biofilms at Different Stages of Development.**Journal of Endodontics**. v. 37 n. 5 p. 657-661, 2011.
- SILVA R.A.M.S, SEIDL A, RAMIREZ L, DÁVILA A.M.R. *Trypanosoma evansie Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e Controle. Corumbá, Embrapa Pantanal. , p 1-162, 2002.

- SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.90, n.2, 2009.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Editora da Universidade/UFRGS / UFSC. p. 183, 2010.
- SIMÕES, C.M.O.E.,SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS,. cap. 18, p. 467-495, 2003.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, p. 15, 71, 2002.
- SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 - 355, 2007.
- SPELLBERG, B.; BLASER, M.; et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, nº5, p. 397-428, 2011
- STEWART, P.S.; COSTERTON J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.**The Lancet**. v. 358 n. 14, 2001.
- SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**. v. 108, p.879 - 884, 2008.
- SUDJANA, A.N, CARSON, C.F.; CARSON, K.C.; RILEY, T.V, HAMMER K.A. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. **Med Mycol**. v.50, n.8, p.863-70, 2012.
- TAMMER I, GEGINAT G, LANGE S, KROPF S, LODES U, SCHLÜTER D ,LIPPERT H, MEYER F Antibiotic Consumption and the Development of Antibiotic Resistance in Surgical Units..2014
- TRABULSI.L.R. - **Microbiologia**. 2a ed. Rio de Janeiro, Atheneu. p.386. 1991.
- UCHIDA K, YOKOTA N & YAMAGUCHI H. In vitro antifungal activity of posaconazole against various pathogenic fungi. **Internat J Antimicrob Agents**. v.18, p.167-172. 2001.
- UEKI, S.Y.M.; MARTINS, M.C.; TELLES, M.A.S.; VIRGILIO, M.C.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.41, n.1, p.1-8, 2005.
- VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.**Chem. Biol. Interact**. v160,p 1–40, 2006.

VAN INGEN, J.; TOTTEN, S.E.; HEIFETS, L.B.; BOEREE, M.J.; DALEY, C.L. Drug susceptibility testing and pharmacokinetics question current treatment regimens in *Mycobacterium simiae* complex disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.39, p.173-176, 2012.

VANHAELEN, M., LEJOLY, J., HANOCQ, M. et al. **The Medicinal Plant Industry, USA**, 1991.

VANHAMME, L.; PATURIAUX – HANOCQ, F.; POELVOORDE, P. ; NOLAN, D. P.; LINS, L.; VAN DEN ABEELE, J.; PAYS, A.; TEBABI, P.; VAN XONG, H.; JACQUET, A.; MOQUILEVSKY, N.; DIEU, M.; KANE, J. P.; DE BAETSELIER, P.; BRASSEUR, R.; PAYS, E. Apolipoprotein L -1 is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 83-87, 2003.

VASCONCELLOS, M. F. Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf
Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, 2009

VEIT, M.; BECKERT, C.; HOHNE, C.; BAUER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **Phytochemistry** . v38, p881–891, 1995.

VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**. v.16, n.10, p. 496-506, 2008.

WAGNER, H, FARNSWORTH, N.R. Economic and Medicinal Plant Research. San Diego: **Academic Press**, 1990.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WENINGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, n. 2-3, p.193-200, 2001.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, nº 2, p. 99-105, 1998.

YAMANAKA, S.; SATO, K.; FUYU ITO, F.; KOMATSUBARA, S.; OHATA, H. AND YOSHINO, K. Roles of silica and lignin in horsetail (*Equisetum hyemale*), with special reference to mechanical properties. **Journal of Applied Physics**. v111, p 044703. 2012.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Review Nutrition**. v. 21, p. 381-406, 2001.

YARMOLINSKY L et al. Potent antiviral flavone glycosides from *Ficus benjamina* leaves. **Fitoterapia**; v83 p362–367.2001.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. In: Plantas medicinais - sob a ótica da química **Medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p 500, 2001.

