



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular

Elisangela Cristina Coelho Guerreiro de Maria

**Avaliação da ação mutagênica do extrato aquoso de *Equisetum hyemale*
(Cavalinha) e sua caracterização fitoquímica.**

Rio de Janeiro
2021



PPGBMC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR



UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular

Elisangela Cristina Coelho Guerreiro de Maria

Avaliação da ação mutagênica do extrato aquoso da planta de *Equisetum hyemale* (Cavalinha) e sua caracterização fitoquímica.

Dissertação de apresentada ao Curso de
Mestrado do Programa de Pós-Graduação Em
Biologia Molecular e Celular da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo Lima de Oliveira

Rio de Janeiro

2021

De Maria, Elisângela Cristina Coelho Guerreiro

Avaliação da ação mutagênica do extrato aquoso da planta *Equisetum hyemale* (Cavalinha) e sua caracterização fitoquímica.; Orientadora: Profa. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo Lima de Oliveira. Rio de Janeiro, 2021.

78 fl.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: *Equisetum hyemale*, Etnofarmacologia, Fitoterapia, Toxicologia, Antioxidante, Mutagênico.



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular

Elisangela Cristina Coelho Guerreiro de Maria

Avaliação da ação mutagênica do extrato aquoso da planta *Equisetum hyemale* (Cavalinha) e sua caracterização fitoquímica.

A banca Examinadora Composta pelos membros abaixo aprovou a Defesa da
Dissertação

Prof^a. Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo Lima de Oliveira

Prof. Dr^o Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque

Prof^a. Dr^a Andreia da Silva Fernandes Campos

Prof. Dr^a Joelma Freire de Mesquita

Prof. Dr^o Frederico Castelo Branco

DEDICATÓRIA

Aos meus maravilhosos pais Solange e Jose Eustáquio, meu irmão Alexandro, minhas irmãs Emanuella e Angélica, meu marido Alexandre, meus filhos Larissa e Artur e todos os meus sobrinhos Richard, Vitória, Gustavo, Alexander e Miguel, cujo amor e o incentivo me oferecem obstinação para alcançar meus objetivos e serenidade para lidar com os desafios. Gratidão por vocês existirem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela energia, força e luz que obtive em todos os momentos que precisei ser resiliente, persistente, corajosa e superar os desafios que a vida me impôs.

A minha orientadora a Dra. Claudia Aiub, pela sua alegria, determinação, persistência, dedicação, produtividade, paciência, empatia, pela confiança e todo o conhecimento transmitido na orientação deste trabalho. Muito obrigada por me incentivar em todos os momentos que precisei e tornar possível a realização deste sonho.

Ao meu coorientador o Dr. Carlos Fernando, pelo apoio, paciência, incentivo, ensinamentos e incansável colaboração na construção deste Trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos foi muito importante para conclusão desta monografia e para o meu crescimento como profissional.

A todos os meus amigos do laboratório de Genotoxicidade, Ana Carolina, Gustavo, Marcela e Leticia, é sempre uma alegria trabalhar e aprender com vocês. Os ensinamentos, a colaboração, a confiança e principalmente a amizade, foi importantíssimo para a finalização deste trabalho. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, pela oportunidade de receber o grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular pela oportunidade, infraestrutura e subsídios necessários para que eu pudesse realizar todos os experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular pelos ensinamentos, empatia, apoio, disponibilidade e incentivo, em especial a professora Dra. Carmen Lucia Antão Paiva pela confiança de autorizar a utilização do seu laboratório sempre que foi necessário.

À minha mãe Solange, por está presente em todos os momentos felizes e tristes da minha vida. Por acreditar em mim todos os dias e sempre me diz palavras positivas, me amando de forma incondicional.

A meu pai José Eustáquio, por ter me dado o dom da vida.

Ao meu irmão Alexandre, às minhas irmãs Emanuella e Angélica, todos os meus sobrinhos Richard, Vitória, Gustavo, Alexander e Miguel pelo apoio, amor, amizade, companheirismo e incentivo.

À meu marido Alexandre, companheiro de todas as horas, por seu apoio incondicional nos momentos mais difíceis, por seu cuidado, por seu amor, por sempre acreditar em mim. Dando-me confiança e tranquilidade para realizar meus objetivos. Aos nossos filhos amados, Larissa e Artur que, além da inspiração, apoiaram-me com paciência apesar dos momentos de ausência para dedicar-me ao trabalho. Amo muito vocês!

Além disso, gostaria de agradecer aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e por estarem acompanhando e participando deste momento tão aguardado da minha vida.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e na minha trajetória, meus mais sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Senhor..
Conceda-me serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar...
Coragem para modificar as coisas que posso...
E sabedoria para separar umas das outras."
São Francisco de Assis

RESUMO

De Maria, Elisangela Cristina Coelho Guerreiro. Avaliação da ação mutagênica do extrato aquoso da planta *Equisetum hyemale* (Cavalinha) e sua caracterização fitoquímica. 2021. 75f. Dissertação (Pós-Graduação Em Biologia Molecular e Celular) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A *Equisetum hyemale*, também conhecida popularmente como cavalinha, tem sido usada na medicina tradicional para tratar várias doenças, como hipertensão, diarreia, infecções renais, doenças oculares, câncer, acidente vascular cerebral, hemorragia e distúrbio urinários, apresentando potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante relacionado à sua composição química. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antioxidante, mutagênico e toxicológico do extrato aquoso de *E. hyemale*. Experimentos foram realizados para quantificar o conteúdo fenólico total, analisar o potencial antioxidante, avaliar a capacidade de indução de mutação reversa bacteriana e a citotoxicidade em modelo bacteriano. O conteúdo fenólico total foi determinado pelo ensaio Folin Ciocalteu e apresentou um teor de polifenóis de 9,48 mg de equivalentes do padrão ácido pirogálico /g de extrato. Para avaliar o potencial antioxidante foi analisado a captura do radical livre DPPH. Neste ensaio a *E. hyemale* apresentou o valor de IC₅₀ em 15,53 µg/mL. O potencial mutagênico e toxicológico foram analisados pelo Teste de Ames, na ausência e na presença de ativação metabólica, nas cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium nas concentrações 5000, 500, 50, 5 e 0,5 µg/placa do extrato aquoso da planta *E. hyemale*. Foi observado que nenhuma concentração do extrato desta planta foi mutagênico e tóxico na ausência de ativação metabólica exógena. Contudo, na presença desta, foram detectadas indução de mutagenicidade nas maiores concentrações (5000 µg/placa e 500 µg/placa), nas cepas TA98, TA100 e TA102. Além disso, a cepa TA100 apresentou porcentagem de sobrevivência inferior a 50% na concentração 5000 µg/placa mostrando uma resposta citotóxica. Concluindo, os resultados demonstraram que o extrato aquoso apresentou potencial antioxidante nas concentrações de até 50 µg/placa. Portanto, os resultados dos experimentos realizados na *E. hyemale* constituíram um importante passo para estabelecer a dose diária máxima recomendada com uso seguro de eficácia, podendo ser indicada até esse limite, nas indicações terapêuticas utilizadas na medicina popular.

Palavras-chave: *Equisetum hyemale*, Etnofarmacologia, Fitoterapia, Toxicologia, Antioxidante, Mutagênico

ABSTRACT

De Maria, Elisangela Cristina Coelho Guerreiro. Mutagenic evaluation of the aqueous extract from *Equisetum hyemale* (*Cavalinha*) and its phytochemical characterization. 75f. Master Paper (Post Graduation in Molecular and Cellular Biology) – Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Equisetum hyemale, also popularly known as horsetail, has been used in traditional medicine to treat various diseases such as hypertension, diarrhea, kidney disease, eye disease, cancer, stroke, bleeding and urinary disturbance, with antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant potential related to its chemical composition. The aim of this work was to investigate the antioxidant, mutagenic and toxicological potential of the aqueous extract of *E. hyemale*. Experiments were carried out to quantify the total phenolic content, to analyze the antioxidant potential, to evaluate the ability to induce bacterial reverse mutation and cytotoxicity using a bacterial model. The total phenolic content, determined by the Folin Ciocalteu assay, presented a polyphenol content of 9.48 mg equivalents of the extract pyrogalic acid/g. In order to evaluate the antioxidant potential, it was analyzed the capture of the DPPH free radical. In this assay, *E. hyemale* presented an IC₅₀ value of 15.53 µg/mL. The mutagenic and toxicological potential were analyzed by the Ames Test, in the absence and presence of exogenous metabolic activation, for TA97, TA98, TA100, TA 102 and TA104 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains, at 5000, 500, 50, 5, 0.5 µg/plate of aqueous *E. hyemale* extract. It was observed that no concentration of this plant extract was mutagenic and toxic in the absence of metabolic activation. However, in the presence of them, mutagenic activities were detected at higher concentrations ((5000 µg/placa e 500 µg/placa) for TA98, TA100 and TA102 strain. In addition, TA100 strain showed a cytotoxic response. The results showed that the aqueous extract present an antioxidant potential at concentrations till 50 µg/plate, with no mutation and cytotoxic induction. So, the results of the experiments carried out on *E. hyemale* were an important step towards establishing the maximum daily dose recommended with effective and safe, that should be used in the therapeutics for popular medicine.

Keywords: *Equisetum hyemale*, Ethnopharmacology, Phytotherapy, Toxicology, Antioxidant, Mutagenic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a.C	Antes de Cristo
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
his	Histidina
S9	Fração microsomal - Homogenato de fígado de Ratos Sprage-Dawley
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
FDA	Administração de Comidas e Remédios
EMA	Agência Europeia de Medicamento
NCI	Instituto Nacional do Câncer
WHO	Organização Mundial da Saúde
BER	Base excision repair / Reparo por excisão de Base
NER	Nucleotide excision repair/ Reparo por excisão de nucleotídeos
LPS	Lipopolissacarídeos
EAP	Equivalente de ácido pirogálico
EC50	Half maximal effective concentration/ Concentração do extrato efetivo que induz metade (50%) do efeito máximo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ilustração das plantas <i>Equisetum arvense</i> e <i>Equisetum hyemale</i> .	19
FIGURA 2. Planta <i>Equisetum hyemale</i> .	24
FIGURA 3. Reação da substância redutora com reagente de Folin Ciocalteu	33
.	
FIGURA 4. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH.	37
FIGURA 5. Teste de Ames.	49
FIGURA 6. Teste de Sobrevivência.	50
FIGURA 7. Teste de confirmação da mutação <i>rfa</i> na linhagem TA 102.	54
FIGURA 8. Teste de confirmação da mutação <i>uvrB</i> .	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Estudos Químicos de <i>Equisetum</i>	21
TABELA 2. Volumes das soluções para construção da curva padrão do ensaio de <i>Folin Ciocalteu</i> em microplaca, utilizando o ácido pirogálico.	35
TABELA 3. Volumes de reagentes para o ensaio de Folin Ciocalteu em microplaca com as concentrações da planta <i>Equisetum hyemale</i> .	36
TABELA 4. Volumes das soluções para construção da curva padrão do ensaio de DPPH em microplaca, utilizando o ácido ascórbico.	38
TABELA 5. Volumes das soluções para construção da curva do <i>Equisetum hyemale</i> de DPPH em microplaca.	39
TABELA 6. Característica genética das linhagens de <i>Salmonella</i> entérica sorovar typhimurium.	43
TABELA 7. Características a serem observadas na checagem de fenótipos das cepas de <i>S. entérica</i> sorovar Typhimurium.	45
TABELA 8. Controles Positivos no Teste de Ames e na checagem de fenótipos	47
TABELA 9. Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do extrato da planta <i>Equisetum hyemale</i> no teste de Ames sem ativação metabólica (-S9).	57
TABELA 10: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do extrato da planta <i>Equisetum hyemale</i> no teste de Ames com ativação metabólica (+S9).	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Equação da reta do ensaio de Folin- Ciocalteu	52
GRÁFICO 2. Curva de capacidade captadora de radicais livres	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Fitoterapia e Plantas medicinais	17
1.2. Descrição do gênero <i>Equisetum</i>	18
1.3. <i>Equisetum hyemale</i>	23
1.4. Forma de comercialização da planta <i>Equisetum hyemale</i>	25
1.5. Importância das Análises fitoquímicas	26
1.6. A importância dos testes mutagênicos e de genotoxicidade	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Material Vegetal, Extrato e Diluição	32
3.2. Modelo não-biológico - Análise Fitoquímicas	32
3.2.1. Quantificação de Polifenóis Totais - Ensaio de Folin-Ciocalteu	32
3.2.2. Avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH	36
3.3. Modelos Biológicos	40
3.3.1. Modelo Procarioto	40
3.3.1.1. Linhagens Bacterianas	41
3.3.1.2. Checagem de fenótipos	44
3.3.1.3. Metabolização exógena	47
3.3.1.5. Ensaio de Mutagenicidade <i>in vitro</i> (Teste de Ames)	48
3.3.1.5. Ensaio de sobrevivência bacteriana	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Modelo não biológico - Análise fitoquímica	51
4.1.1. Quantificação de Polifenóis Totais - Ensaio de Folin-Ciocalteu	51
4.1.2. Avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH	52
4.2. Modelo Procarioto	53
4.2.1. Checagem de fenótipos	53
4.2.2. Ensaio de Mutagenicidade <i>in vitro</i> (Teste de Ames) e ensaio	56

de sobrevivência	
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Justificativa das metodologias	60
5.2. Amostra e modelo não biológico	61
5.3. Modelo biológico	62
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fitoterapia e Plantas medicinais

A fitoterapia é a utilização de plantas para tratamentos medicinais. A palavra se origina do grego *therapeia* que significa tratamento e *phyton*, vegetal. É considerado fitoterápico toda a preparação farmacêutica (extratos, tinturas, pomadas, cápsulas, rasura e outras formas farmacêuticas) que utiliza como matéria prima componentes vegetais (folhas, caules, raízes, flores e sementes) de conhecido efeito farmacológico (CHINSAMY *et al.*, 2014). O tratamento com fitoterápicos podem ser tão eficientes quanto os fármacos sintetizados quimicamente (ANVISA, 2018).

As propriedades terapêuticas existentes nas plantas foram sendo descobertas por meio da observação e experimentação feita por povos antigos e propagada de geração em geração fazendo parte da cultura popular. Há relatos do uso de plantas com finalidade curativa por volta de 3000 a.C pelos povos orientais (WAGNER & KOLTER, 1990).

As plantas medicinais no Brasil são utilizadas de diversas maneiras e com diferentes propósitos, seja *in natura*, com partes inteiras ou sob a forma para preparação de infusão “chás” e/ou outros preparos caseiros. São destinadas ao uso doméstico ou em rituais religiosos, espirituais de cura e transcendência sob a forma pulverizada, extratos brutos ou frações enriquecidas, extratos padronizados, tinturas, extratos fluidos, pós, comprimidos, cápsulas, e, finalmente, podem ser submetidas a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento das substâncias de interesse (RATES, 2001).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas. Contudo apenas 8% da flora brasileira foram estudadas a fim de encontrar novos compostos bioativos e 1100 espécies tiveram suas propriedades medicinais avaliadas. Totalizando somente 590 plantas registradas no Ministério da Saúde para a comercialização (GUERRA & NODARI, 2001).

Além desse acervo genético, também apresenta rica diversidade étnica e cultural. Neste contexto, é recomendado pelo Ministério da Saúde pesquisas para

garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinal e fitoterápicos (BRASIL, 2016).

Cerca de 100.000 compostos oriundos de plantas já foram identificados e a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda pesquisas com plantas medicinais para fins curativos, no intuito de obter novas alternativas terapêuticas (ANVISA, 2006).

No entanto, o uso de plantas medicinais de forma indiscriminada ou negligenciada pode ser potencialmente agressivo, devendo-se ter cautela e respeitar os riscos de toxicidade. Um exemplo disso é o efeito hepatotóxico de apiol, safrol, lignanas e alcalóides bem como a ação tóxica renal causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

1.2. Descrição do gênero *Equisetum*

O *Equisetum* é o único gênero que representa a família *Equisetaceae* possuindo aproximadamente 30 espécies. Este gênero é comum nas cidades e está presente em todos continentes exceto Austrália e Antártida. Elas são plantas perenes e herbáceas, secando no inverno (para a maioria das espécies temperadas) ou sempre verde (algumas espécies tropicais, e a espécie temperada *Equisetum hyemale*). A maioria delas crescem de 0,2 – 1,5 m de altura, embora a *E. telmateia* possa excepcionalmente alcançar 2,5 m, e a espécie tropical *E. giganteum* 5 m, e *E. myriochaetum* 8 m (LORENZI & MATTOS, 2006).

Os vegetais deste gênero não possuem flores e, conseqüentemente, não apresentam sementes; algumas espécies possuem folhas verticiladas, mas reduzidas a tamanho insignificante e caule aéreo que são verdes e fotossintetizante apresentando como características distintas o fato de seremocos com textura áspera ao tato por causa da presença de silício, com nós e entrenós característicos de 0,7 a 4 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento. Os brotos aéreos perpendiculares e rizomas subterrâneos são quase uniformes quanto à altura, ascendentes e com nervuras. (RADULOVIC *et al.*, 2006).

Os rizomas podem atingir até 2 metros de comprimento abaixo do solo, dificultando a erradicação do vegetal em caso de invasão de campos e lavouras. Assemelham-se com um rabo de cavalo e por este motivo, todas as espécies de gênero são conhecidas popularmente como cavalinha, como pode ser visualizado na FIGURA 1 (NIKLAS, 1989).

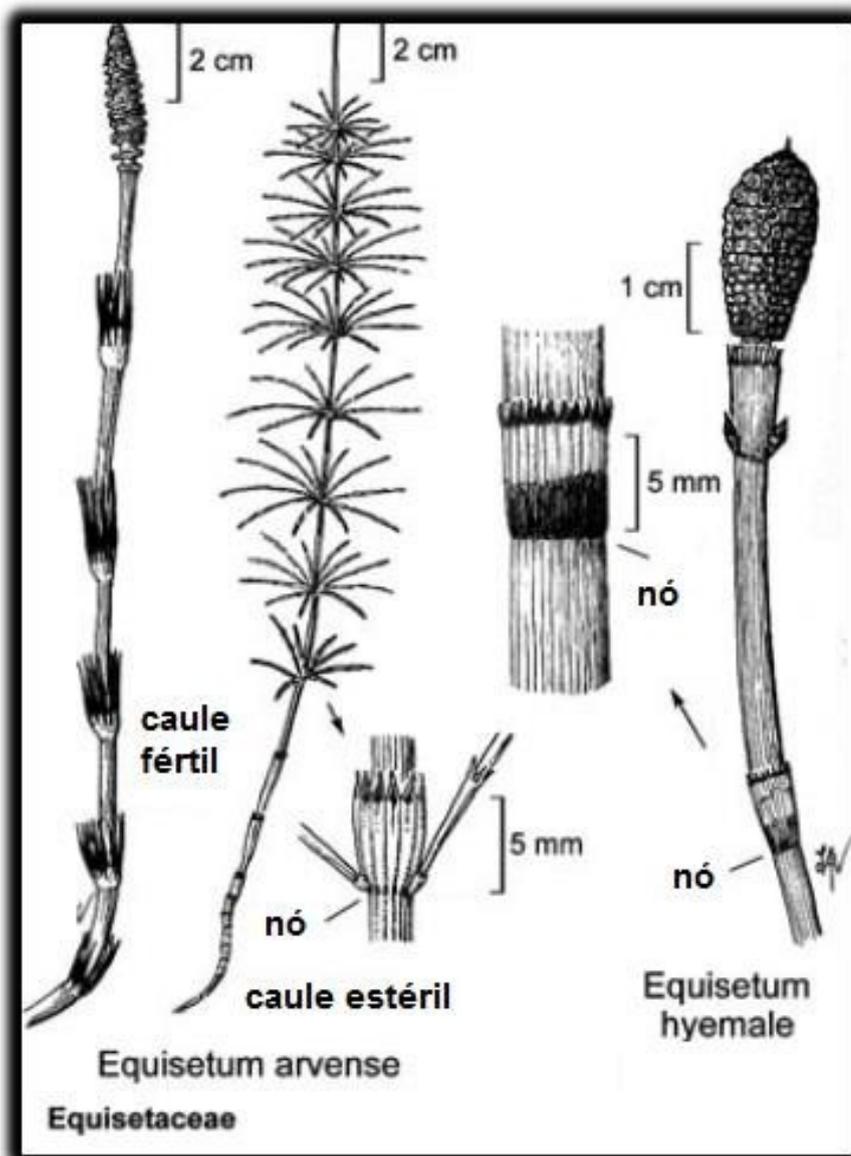


FIGURA 1. Ilustração das plantas *Equisetum arvense* e *Equisetum hyemale*.
Fonte: Herbário Jepson - Universidade da Califórnia, Berkeley, 2021

Descrito pela primeira vez por Lineu, em 1753, o gênero *Equisetum*, pertencente à divisão Sphenophyta, é originário do fim da era paleozoica, cerca de 300 milhões de anos atrás. É o único gênero não extinto da classe Equisetopsida, e pode ser o gênero mais antigo não extinto da terra (OLSEN, 2007).

São uniformemente distribuídas no mundo e acredita-se que sua datação fóssil seja anterior à deriva dos continentes e isso explicaria a sua alta adaptação a diferentes climas. A cavalinha é comumente encontrada em climas tropicais e temperada, principalmente na América Central, América do Sul e Brasil. No início da primavera surge o caule fértil, geralmente curto, apresenta na extremidade brotos férteis e não ramificados da cor marrom, que serve para a sua reprodução, que, porém, também pode ocorrer através de rizomas e no verão, o caule estéril apresentam brotos inférteis verde, geralmente longos, surge depois que o caule fértil murcha (OH *et al.*, 2004).

Normalmente nas espécies de *Equisetum* são utilizadas as suas hastes na medicina tradicional, na forma de infusões, principalmente como anti-inflamatório, diuréticos, digestivos, antianêmico e antimicrobiano, sendo empregado também para tratamento de gonorréia, diarreia, infecções dos rins, bexiga e doenças oculares (REUTER & GARCIA, 2010).

No Brasil, a espécie *Equisetum arvense* está inserida na relação nacional de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da hipertensão arterial. Além disso, a espécie de *Equisetum arvense* foi oficializada na Farmacopéia Brasileira por meio do Memento fitoterápico – Farmacologia Brasileira – 1 edição de 2016 (ANVISA, 2016).

A forma mais utilizada da *Equisetum arvense* na medicina popular é a infusão de 2 a 3g da sua parte aérea em 250 mL de água (1 xícara de chá) sendo administrada via oral em adulto. Sendo a dose diária máxima recomendada de 12g de *E. hyemale* em 1000 mL de água (4 xícaras de chás) (ANVISA, 2016).

A utilização dessas espécies do gênero *Equisetum* no tratamento de algumas patologias está associada com a presença de altos teores de minerais, principalmente silício e metabólitos secundários, como por exemplo, saponinas, flavonóides, taninos e alcalóides, que atuam de forma sinérgica (REUTER & GARCIA, 2010).

Além disso, as espécies de *Equisetum* são constituídas de: sais de potássio, magnésio, cálcio, fósforo, sódio, flúor e alumínio, apresentando mais de 10% dos constituintes inorgânicos. São encontrados compostos solúveis a base de silício, Si(OH)_4 ou $\text{Si(OH)}_3\text{O}^-$ que estão presentes no caule da erva e representam de 10 à 15% dos constituintes totais. Também estão presentes os taninos, flavonoides, a

exemplo de isoquercitrina, saponinas, alcaloides como nicotina, e pequena quantidade de óleos essenciais (D'AGOSTINHO *et al.*, 1984; WICHTL *et al.*, 1994; HOLZHUTER *et al.*, 2003; RADULOVIC *et al.*, 2006; BERTALOT *et al.*, 2010). Se tratando do fármaco seco, o mínimo de 0,3% de flavonoides totais deve ser expresso em isoquercitrina (Farmacopéia Portuguesa VIII, 2005). Os resultados dos estudos químicos estão sumarizados na TABELA 1.

TABELA 1 - Estudos Químicos de *Equisetum*

Resultados	Referências
Esteróis: beta-sitosterol (60%), campesterol (32,90%), Isofucosterol (5,9%) e colesterol (traços) e triglicerídeos	D'AGOSTINHO <i>et al.</i> , 1984
Isoquercitrina, minimo de 0,3% do total	Farmacopéia Portuguesa VIII, 2005
Alcalóides (nicotina, equispermina e palustina)	FERRAZ <i>et al.</i> , 2008
Sais minerais: potássio, magnésio, cálcio, m fósforo, sódio, flúor e alumínio	D'AGOSTINHO <i>et al.</i> , 1984
Sílica e ácidos silícicos Si(OH) ₄ ou Si(OH) ₃ aproximadamente 10 e 15% do total	HOLZHUTER <i>et al.</i> , 2003, FERREIRA <i>et al.</i> , 1999
Saponinas (equisetomia) aproximadamente 5% do total	SCHENKEL <i>et al.</i> , 2000, WICHTL <i>et al.</i> , 1994
Flavonas glicosadas (isoquercitrina, equisetina e galuteolina)	WICHTL <i>et al.</i> , 1994, F. Farmacopéia Portuguesa VIII, 2005
Ácido ascórbico	SILVA & CARMO, 2009
Cristais de KCl, compostos fenólicos, flavonóides (luteolina)	WICHTL <i>et al.</i> , 1994
Resinas e taninos (ácidos gálico)	MARTINS <i>et al.</i> , 2000, COSTA SANTOS , 2007
Óleos voláteis: hexahidrofarnesil acetona (18,34%), cisgeraniil acetona (13,74%), timol (12,09%) e trans- fitol (10,06%)	RADULOVIC <i>et al.</i> , 2006

Legenda: Resultados dos estudos químicos do gênero *Equisetum*.
 Fonte: MELLO & BUDEL, 2014.

Estudos apontam que a utilização de *E. arvense* deve ser contraindicado para menores de 12 anos, grávidas, lactantes e pacientes com histórico de hipersensibilidade e alergia a qualquer um dos componentes do fitoterápico, bem como para pacientes nos quais a ingestão reduzida de líquidos é recomendada, como por exemplo em algumas doenças cardíacas e renais severas (SOLEIMANI *et al.*, 2008; SANDHU *et al.*, 2010; EMA., 2015).

A ingestão crônica da infusão feita a partir da rasura da “haste” da *E. arvense* diminui os níveis da vitamina B1 (tiamina) e o efeito diurético pode causar a perda de potássio (hipocalemia) (SANDHU *et al.*, 2010). Em pacientes que apresentam insuficiência renal crônica e que fazem uso de medicamentos que alteram níveis de potássio, pode causar hipercalemia (EMA, 2015). Relatos do uso de extratos de *E. arvense* podendo inibir a enzima CYP1A2 e interferindo possivelmente com fármacos metabolizados por essa via também foram descritos na literatura (LANGHAMMER & NILSEN, 2014).

A espécie de *E. arvense* apresenta como classes químicas descritas na literatura monoterpênicos, dinorditerpenoides, dinorsesquiterpenoides, cumarinas, alcaloides, mucilagens, minerais, flavonoides e saponinas (BROUDISCOU & LASSALAS, 2000; MONTE *et al.*, 2005; RADULOVIC *et al.*, 2006; KAZYIAMA *et al.*, 2012, CARNEIRO *et al.*, 2014).

Em ensaio em camundongos utilizando o extrato hidroetanólico de *E. arvense* houve efeitos anticonceptivo e anti-inflamatório (MONTE *et al.*, 2005). Por outro lado, no estudo realizado em ratos Wistar tratadas por via oral, com três diferentes doses de extrato etanólico de *E. arvense* (30 mg/kg, 60 mg/kg e 120 mg/kg) por um período de 30 dias, embora não tenham sido observados efeitos tóxicos referentes aos sinais clínicos, o peso corporal e peso de órgãos, na dose de 60 mg/kg foi encontrado diferença significativa em relação ao grupo controle para os parâmetros hemato-bioquímicos. Os parâmetros histológicos do tecido hepático de todos os três grupos mostraram arquitetura celular normal. A análise histopatológica do osso do fêmur mostrou diminuição na largura trabecular, sugerindo efeito tóxico do extrato na dose de 60 mg/kg. Assim, o estudo concluiu que o extrato etanólico de *E. arvense* produz efeito tóxico de forma dose-dependente (BADOLE & KOTWA, 2015).

Recentemente, foi relatado que os extratos etanólicos e metanólicos de *E. hyemale* possuem em sua constituição compostos fenólicos, que são os

responsáveis pelas atividades de eliminação de radicais livres e antifúngica (DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

Testes como de atividade antifúngica, já foram realizadas com extratos de *E. arvense*, que demonstrou ser eficaz na inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* e na produção de afloxotinas. A mesma espécie na concentração de 50 µg/mL inibiu totalmente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candido albicans*, *C. tropicalis* e *V. glabrata*. Resultados como esses demonstram que o gênero *Equisetum* possui potencial para ser utilizado como alternativa de tratamento para diversas infecções (ROMERO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.3. *Equisetum hyemale*

A pteridófito *E. hyemale* pertencente á divisão Sphenophyta e a família Equisetaceae. É conhecida como Cavalinha, tratando-se de uma planta aérea encontradas em climas tropicais e temperadas com distribuição quase cosmopolita, exceto na Austrália e Nova Zelândia (KOREA, 1998). Apresenta ampla distribuição demográfica na região sul do Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

A espécie *E. hyemale* é uma planta perene e herbácea. Apresenta o caule verde cilíndrico e fotossensível, que possuem no máximo 0,8 cm de diâmetro que atingem até 3 m de altura. Suas folhas são pequenas e unidas no entorno do caule que apresenta como característica distinta o fato de ser oco e pontiagudo, com juntas e estrias. Não floresce, sua reprodução se dá pela capacidade de produção de esporos (PARK & JEON, 2008). Como pode ser visualizado na FIGURA 2.



FIGURA 2. Planta *Equisetum hyemale*.

Fonte: LANSDOWN, 2014

Além disso, *E. hyemale* pertence ao gênero *Equisetum* que é conhecido como o maior acumulador de sílica entre as plantas terrestres, apresentando em sua estrutura, aproximadamente 25% da massa seca composto 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 predadores. Inclusive, 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 eles 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.*, 2008).

Os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas, geralmente estão intimamente relacionados com os metabólicos secundários, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológicos (WIJESEKERA, 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 (BENNETT & WALLSGROVE, 1994).

Neste cenário, 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 em especial apresentam ativos biologicamente contra bactérias, fungos, vírus, além de demonstrarem propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (ORHAN *et al.*, 2010). Evidenciado nos últimos anos, com a publicação de artigos que anunciam estas propriedades (DE QUEIROZ *et al.*, 2015) e (ALVES *et al.*, 2019).

De uma maneira geral, as hastes desta planta são utilizadas na medicina popular, na forma de infusão para tratar várias doenças, como hipertensão (BARRETTO & SANTELLO, 2002), diarreia, infecções renais, doenças oculares (YAMANAKA *et al.*, 2012), câncer (MEYER *et al.*, 2012), acidente vascular cerebral, hemorragia e distúrbio urinários (HONGXIA *et al.*, 2012).

1.4. Forma de comercialização da planta *Equisetum hyemale*

A *Equisetum hyemale* é uma planta medicinal utilizada com propósitos terapêuticos comercializada na forma de fármaco vegetal ou na forma de medicamento fitoterápico. Após a colheita, as hastes desta planta sofrem processo

de rasura (partida em pedaços menores) e secagem em estufa (GARCIA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011).

As formas como a cavalinha vêm sendo comercializada em lojas de Fitoterápicos variam de: Tintura: (1:4-5) em solução hidroetanólica a 31,5% (p/p); Tintura (1:5) em solução hidroetanólica a 96% (v/v); Cápsula e comprimido contendo extrato seco (4- 7:1) com extração aquosa; Cápsula e comprimido contendo extrato seco (7,5-10,5:1) com extração hidroetanólica a 70% (v/v);(8) Chá medicinal (infusão) (GARCIA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011).

Da mesma forma, a indicação, administração e posologia também são bem variadas. Para o uso oral adulto têm-se indicação de 3 a 4 doses por dia, por duas ou quatro semanas, (i) da infusão de folhas ou partes aéreas de 2-3 g em 250 mL de água fervente, ou (ii) a utilização da droga vegetal rasurada: 570 mg; ou (iii) a tintura:(1:4-5) em solução hidroetanólico a 31,5% (p/p): 20 gotas; ou (iv) a tintura: (1:5) em solução hidroetanólico a 96% (v/v): 30 a 40 gotas; ou (v) o extrato seco (4- 7:1) com extração aquosa: 185 mg; ou (vi) o extrato seco (7,5-10,5:1) com extração hidroetanólica a 70% (v/v): 200 – 225 mg (BRASIL, 2011; EMA, 2015; NAGAI *et al.*, 2005).

Os compostos vegetais não podem ser confundidos com os medicamentos fitoterápicos. Ambos são obtidos de plantas medicinais, porém elaborados de forma diferenciada. Enquanto os compostos vegetais são constituídos da planta medicinal ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias ativas, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização, secagem, podendo ser íntegra, rasurada (partida em pedaços menores) ou triturada utilizada na preparação na forma de infusão dos populares “chás”, os medicamentos fitoterápicos são produtos tecnicamente mais elaborados, apresentados na forma final de uso (comprimidos, cápsulas e xaropes), o que significa que foram submetidos a processos farmacotécnicos (BRASIL, 2010).

1.5. Importância das Análises fitoquímicas

As análises fitoquímicas utilizadas fornecem informações relevantes da presença de metabólitos secundários nas plantas. Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades

biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG & LUBERT, 2008).

Esses metabólicos, são compostos biologicamente ativos, estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio. Assim, despertam grande interesse, não só pelas importantes funções ecológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana. Por isso nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada a ação dos compostos presentes em alimentos de origem vegetal na manutenção da saúde humana (MARTINS *et al.*, 2016; WINK, 2016).

Visto que os metabólicos secundários apresentam diversas atividades biológicas que lhe confere significativas importâncias farmacológicas, como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatório, dado que são capazes de atuar modulando células envolvidas com a inflamação e antimicrobiana (HAVSTEEN, 2002; COUTINHO, *et al.*, 2009).

Os metabólicos secundários possuem três grupos de agentes fitoquímicos mais importantes que são os terpenos (várias unidades de isopreno), os alcaloides (compostos nitrogenados heterocíclicos) e os compostos fenólicos (também chamados polifenóis). Os compostos fenólicos compõem o maior grupo, com mais de 8.000 estruturas identificadas e largamente distribuídas. Esses compostos apresentam como modelo estrutural básico em grupo fenol, constituído por um anel aromático hidroxilado. No entanto, os polifenóis apresentam ampla diversidade estrutural, sendo agrupados em diferentes classes de acordo com a sua estrutura química básica (MARTINS *et al.*, 2016, SILVA *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2016,).

A estrutura dos compostos fenólicos varia de uma simples molécula a um complexo polímero de elevado peso molecular. O potencial antioxidante desses compostos depende do número e disposição dos grupos hidroxilas na molécula de interesse (SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015)

Os compostos polifenóis das plantas como fenóis simples, ácido fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, ligninas são antioxidantes naturais, capazes de inibir ou reduzir a ação de radicais livres. Essas substâncias apresentam a atividade

antioxidante devido principalmente às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou no sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, utilizando diversos mecanismos: (a) eliminação de espécies que iniciam a peroxidação, (b) quelação de metais para impedir a geração de espécies reativas ou decomposição de peróxidos, (c) interação com O₂ para a prevenção da formação de peróxidos, (d) interrupção da reação em cadeia de auto-oxidativa, e/ou (e) redução de concentrações de O₂ localizadas agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (OROIAN & ESCRICHE, 2015; SHAHIDI & ZHONG, 2015).

Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (TAOFIQ *et al.*, 2015).

Evidências indicam que um desequilíbrio causado por produção excessiva de radical livre, de forma endógena (reações metabólicas) ou por fatores exógenos (radiações ionizantes, por exemplo), ocasiona o aumento do estresse oxidativo, podendo danificar as moléculas biológicas, tais como proteínas, hidratos de carbono, lipídeos e DNA, que está fortemente relacionado a uma ampla variedade de doenças humanas, como doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes (IRONDI *et al.*, 2015, SHAO *et al.*, 2014 e TAOFIQ *et al.*, 2015).

As plantas e os seus constituintes são fontes de antioxidantes naturais tais como os compostos fenólicos, que são encontrados em abundâncias em especiarias, ervas, frutas, legumes, cereais, grãos, sementes, chás e óleos. Esses compostos são parte essencial da dieta humana e são de considerável interesse, devido às suas propriedades antioxidantes e efeitos benéficos potenciais à saúde humana (AHMAD *et al.*, 2016).

Segundo REUTER & GARCIA 2010 as espécies do gênero *Equisetum* apresentam altos teores de metabólitos secundários, como por exemplo, saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides. Estes metabólicos são antioxidantes naturais, capazes de inibir a ação de radicais livres.

1.6. A importância dos testes de mutagenicidade e de genotoxicidade

Agente tóxico é a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposições que envolvem um aspecto quantitativo e outro qualitativo (KLASSEN & WATKINS, 2012; OGA *et al.*, 2014).

O aspecto quantitativo significa que praticamente toda substância, perigosa em certas doses, pode ser desprovida de perigo em doses muito baixas. Como, por exemplo, o cloreto de vinila, que é um potente hepatóxico em doses elevadas, é um carcinógeno em exposição prolongada a baixas doses e, aparentemente, desprovido de efeito nocivo em doses muito baixas (KLASSEN & WATKINS, 2012; OGA *et al.*, 2014).

No aspecto qualitativo, pode-se considerar que uma substância nociva para uma espécie ou linhagem, pode ser desprovida de perigo para outra espécie, como por exemplo, o tetracloreto de carbono, altamente hepatológico para várias espécies, incluindo o homem, e relativamente seguro para frangos. Outras condições da exposição ao xenobiótico também interferem no aparecimento ou não do efeito nocivo, como via de introdução, a duração e a frequência de exposição, entre outras (OGA *et al.*, 2014).

Por isso é tão importante avaliar os efeitos nocivos provocados por substâncias químicas presentes em plantas, para definir as condições em que estas plantas podem ser ingeridas sem causar danos ao organismo, visto que o consumo de muitas destas substâncias pode ser associada a diversas doenças em humanos (OGA *et al.*, 2014).

Por isso a identificação de substâncias capazes de induzir mutações tornou-se um procedimento importante na avaliação de segurança. Produtos químicos que são capazes de induzir mutações podem potencialmente danificar a linhagem germinativa, levando a problemas de fertilidade e mutações nas gerações futuras. Os produtos químicos mutagênicos também são capazes de induzir alterações permanentes que poderão estar associadas ao desenvolvimento de doenças genéticas, particularmente, de processos cancerígenos e essa preocupação impulsionou a maioria dos programas de teste de mutagenicidade (KLASSEN & WATKINS, 2012; OGA *et al.*, 2014).

Dada a dificuldade em estudar os efeitos carcinogênicos de determinada substância ou composto, utilizam-se os denominados testes mutagênicos e de genotoxicidade com o intuito de avaliar os efeitos relativos aos danos genéticos associados à doença humana (SPONCHIADO *et al.*, 2016).

As mutações são alterações na sequência dos nucleotídeos do material genético de um organismo, provocando diferentes efeitos à saúde e podendo ser classificadas em mutações em pequena escala e mutações em larga escala (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

As mutações em pequena escala são aquelas que afetam um pequeno gene em um ou poucos nucleotídeos, incluindo: de ponto (há a troca de um único nucleotídeo por transição ou transversão), frameshift (ocorre à inserção ou à deleção de um ou mais nucleotídeos na sequência do DNA causando mudança no quadro de leitura dos códons) e in-del (inserção- deleção de um ou mais nucleotídeos) (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

As mutações em larga escala provocando alterações cromatídicas e cromossômicas por clastogênese (isto é, grandes deleções ou rearranjos de DNA, como quebras ou rearranjos cromossômicos promovendo aberrações cromossômicas estruturais) e a aneugênese (isto é, ganho ou perda de cromossomos inteiros promovendo alterações cromossômicas numéricas) (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

Consta que nenhum teste consegue detectar todas as substâncias genotóxicas. Assim, quando há a necessidade de caracterizar a potencial atividade genotóxica de um dado xenobiótico são, em primeiro lugar, realizados testes *in vitro* que incluem testes de mutação gênica em bactérias, como por exemplo, o teste de Ames e ensaios de mutagenicidade e de genotoxicidade em células de mamíferos *in vitro* ((KIRKLAND *et al.*, 2014).

O teste de mutagenicidade em *Salmonella* (também conhecido como Teste de Ames) foi especificamente projetado para detectar mutagênese induzida quimicamente. Ao longo dos anos, seu valor como tal foi reconhecido pela comunidade científica, pelos governos, agências e empresas. Este teste é usado em todo o mundo como uma triagem inicial para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas porque há um alto valor preditivo para

carcinogenicidade de roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (MORTELMANS, 2019).

Diretrizes internacionais também foram desenvolvidas, por exemplo, pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH), para uso por empresas e testes laboratórios para garantir a uniformidade dos procedimentos de teste antes do envio de dados às agências reguladoras para registro ou aceitação de muitos produtos químicos, incluindo medicamentos e biocidas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dessas diretrizes é a ANVISA que usa para fundamentação os documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária (FDA, EMA), e de instituições de interesse na área (ICH, OECD, NCI, WHO), visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional (ANVISA, 2013).

De acordo com o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos são fundamentais testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas (ANVISA, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial antioxidante e mutagênico do extrato aquoso de *E. hyemale*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Quantificar o conteúdo fenólico total do extrato aquoso de *E. hyemale*.
- ✓ Avaliar capacidade sequestrante do extrato - DPPH.
- ✓ Avaliar a capacidade de indução de mutação reversa bacteriana.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade em modelo bacteriano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal, Extrato e Diluição

A espécie de *Equisetum hyemale* foi adquirida pelo fornecedor Florien na forma de rasura contendo o lote do fabricante: CP022019PR, data de fabricação: 01/02/2019, data de validade: 28/02/2021, procedência: Brasil, condição de armazenamento em temperatura ambiente e sendo utilizada a “haste”.

O procedimento foi iniciado com 100 gramas da rasura da *Equisetum hyemale* que foi triturada em um gral com auxílio de um pistilo e nitrogênio líquido. Adicionamos a rasura em água destilada (1L) a 80°C num becker de vidro, ficando 1 hora sob agitação no agitador magnético com aquecimento, para execução do extrato aquoso. Depois, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatmann (4mm) e liofilizado (ARAUJO-LIMA *et al.*, 2020; GALVÃO *et al.*, 2021). O rendimento total do extrato bruto foi de 11,08 g.

O extrato bruto foi estocado ao abrigo da luz, em freezer (-18°C), a fim de manter os componentes presentes no extrato sem possível degradação.

3.2. Modelo não-biológico - Análise Fitoquímica

A utilização de técnicas que definem propriedades fitoquímicas das plantas com atividade biológica é fundamental para que se possa entender de que modo às espécies químicas interagem entre si, promovendo alterações no comportamento dessas moléculas quando em um sistema biológico complexo. Além disso, muitos dos ensaios relativos à atividade biológica têm por princípio a utilização de alterações colorimétricas, fluorimétricas ou espectrofotométricas, dependendo de aparatos não-biológicos para sua execução (GOLLO *et al.*, 2020).

3.2.1. Quantificação de Fenólicos Totais – Ensaio de *Folin Ciocalteu*

Este método espectrofotométrico é simples, reprodutivo e baseia-se na interação das substâncias redutoras com o reagente de *Folin Ciocalteu*. A composição química deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que são reduzidos a partir dos extratos ou substâncias testadas e que, originalmente, possuem coloração amarela. Um meio com pH alcalino propicia que substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, dissociem um próton, levando à formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin Ciocalteu formando óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}). Estes óxidos possuem coloração azul que é detectável na banda do espectro de 760 nm, possibilitando a quantificação dessas substâncias através da espectrofotometria (HUANG & PRIOR, 2005). Assim, a coloração final da reação será tanto mais azul quanto maior a quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas (FIGURA 3).

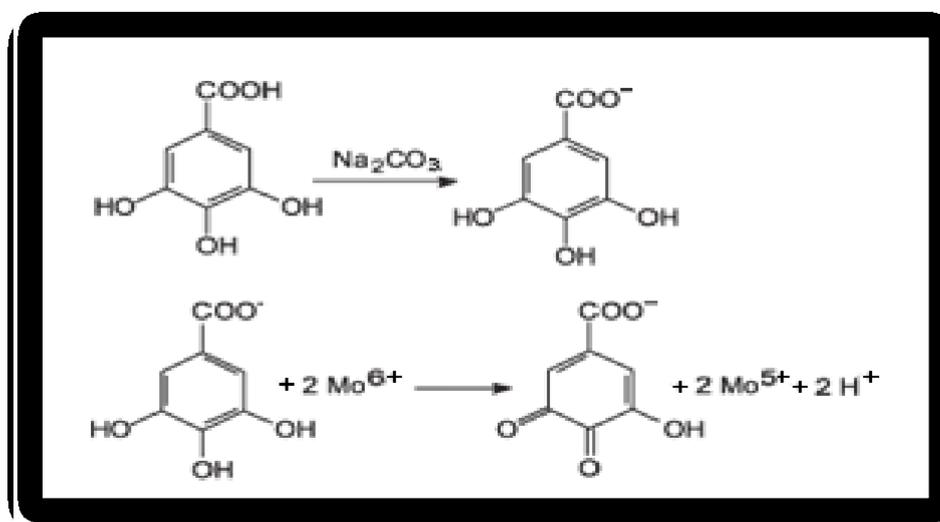


FIGURA 3. Reação da substância redutora com reagente de *Folin Ciocalteu*
Legenda: Reação da substância redutora com reagente de *Folin Ciocalteu*.
No exemplo, o ácido gálico, em condição alcalina reage com o complexo fosfomolibdico do reagente de *Folin Ciocalteu*. Nesta reação, há a mudança na cor, de amarelo para azul, indicando que houve redução do complexo fosfomolibdico. Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2009.

No entanto, o reagente de *Folin Ciocalteu* não é específico só para grupos fenólicos, sofrendo interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra, como ácido ascórbico, proteínas e açúcares redutores (IKAWA *et al.*, 2003).

Contudo, no grande grupo das substâncias fenólicas, os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais. Essas substâncias apresentam-se amplamente distribuídas nas plantas, sendo, desta maneira, encontradas em todas as frutas e outros organismos fotossintetizantes (PIRES *et al.*, 2017a).

As substâncias fenólicas apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas a ele. Sua estrutura química confere atividade redutora para esse grupo de substâncias, que podem atuar doando elétrons ou agindo no sequestro de radicais livres apresentando potenciais antioxidantes (PIRES *et al.*, 2017a).

Atualmente, o ensaio de Folin Ciocalteu é um dos mais aceitos e utilizados para avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra, sendo um ensaio utilizando rotineiramente no estudo de antioxidantes fenólicos, uma vez que se estabelece uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais (FELZENSZWALB *et al.*, 2013).

O método do Folin, utilizado foi descrito por PIRES *et al.*, (2017a) é um procedimento rápido que foi adaptado para microplacas com os objetivos de reduzir a quantidade de biomassa da amostra utilizada, requerer pequenos volumes de reagente e gerar pouco resíduo quando comparado ao protocolo original descrito por SINGLETON & ROSSI (1965) e WATERMAN & MOLE (1994).

Para a curva padrão de ácido pirogálico incluiu-se seis pontos (4, 8, 16, 24, 36, 40 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), além da concentração zero, três réplicas para cada ponto. O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por PIRES *et al.*, (2017a), com algumas modificações.

Utilizou-se uma microplaca de 96 poços, seguindo os volumes de reagentes da TABELA 2. Incubou-se a microplaca por 30 minutos protegida da luz direta à temperatura ambiente, enquanto que a absorvâncias foi lida no espectrofotômetro SpectraMax M5 por meio do SoftMax Pro 6.3 UV/vis a 760 nm. Construiu-se uma

curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão ($\mu\text{g/mL}$) e os valores de absorvância.

TABELA 2. Volumes das soluções para construção da curva padrão do ensaio de Folin Ciocalteu em microplaca, utilizando o ácido pirogálico.

Concentração final do poço ($\mu\text{g/mL}$)	Água destilada (μL)	Folin-Ciocalteu 1N (μL)	Sol. estoque de Ácido Pirogálico 0.8 mg/mL (μL)	Metanol (μL)	Carbonato de sódio (μL)	Volume Total (μL)
0*	200	20	---	20	60	300
4	200	20	1,5	18,50	60	300
8	200	20	3	17	60	300
16	200	20	6	14	60	300
24	200	20	9	11	60	300
36	200	20	12	8	60	300
40	200	20	15	5	60	300

* O concentração 0 corresponde também ao Branco. A absorvância do Branco deve ser descontada em todas as absorvâncias de cada um dos pontos da curva padrão.

Fonte: Adaptado de PIRES *et al.*, 2017a.

Para o ensaio seguiu-se a metodologia descrita por PIRES *et al.*, (2017a) com algumas modificações. Em uma microplaca de 96 poços foi preparado a mistura do ensaio para cada concentração do extrato da *Equisetum hyemale* seguindo os volumes indicados na TABELA 3. Incubou-se a microplaca por 30 minutos protegida da luz direta, à temperatura ambiente e leu-se as absorvâncias no espectrofotômetro SpectraMax M5 por meio do SoftMax Pro 6.3 UV/vis a 760 nm.

TABELA 3. Volumes de reagentes para o ensaio de Folin Ciocalteu em microplaca com as concentrações da planta *Equisetum hyemale*.

Concentração final do poço (µg/mL)	Água destilada (µL)	Folin-Ciocalteu 1N (µL)	Solução do extrato de <i>E. hyemale</i> 0.8 mg/mL(µL)	Metano I (µL)	Carbonato de sódio (µL)	Volume Total (µL)
Branco (0)*	200	20	---	20	60	300
5	180	20	2	18	60	300
10	180	20	4	16	60	300
15	180	20	6	14	60	300
25	180	20	10	10	60	300
35	180	20	14	6	60	300
50	180	20	20	0	60	300
Branco Extrato <i>Equisetum hyemale</i> **	280	---	**	**	---	300

* O valor da absorbância do branco é o mesmo obtido para concentração zero da curva padrão na TABELA 2.

** O extrato da *Equisetum hyemale* é rico em pigmento da cor verde interferindo na leitura da absorbância. Necessitou-se fazer um Branco do extrato para cada uma das concentrações utilizadas. A absorbância do Branco de cada concentração foi reduzido na absorbância do respectiva concentração no ensaio de *. O valor da absorbância do Branco é o mesmo obtido para concentração zero da curva padrão na TABELA 2. Folin Ciocalteu, a fim de descontar possíveis interferência de leitura. Fonte: Adaptado de PIRES *et al.*, (2017a).

Após a leitura realizou-se a quantificação de compostos fenólicos do extrato da *Equisetum hyemale* as quais foram expressas em equivalentes do padrão ácido pirogálico, por massa do extrato (mgEAP/g).

Necessitou-se construir uma curva de regressão linear crescente relacionando as concentrações do ácido pirogálico (mg.mL⁻¹) versus aos seus respectivos valores de absorbância.

3.2.2. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH*

Existem diversos métodos descritos na literatura para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos e/ou substâncias isoladas (ALVES *et al.*, 2010). Um dos ensaios antioxidantes mais comuns é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em metanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004).

Este ensaio se baseia no mecanismo de transferência de elétron, permitindo a medição da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância antioxidante que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada à uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido, ocorrendo um decréscimo da absorbância a 515/517 nm (PIRES *et al.*, 2017b).

Neste processo, ocorre uma reação de oxirredução, onde o radical DPPH, que apresenta a coloração violeta, sendo reduzido por uma determinada substância com potencial antioxidante para o DPPH-H (DPPH reduzido e estável), alterando a coloração da mistura de roxo para amarelo (FIGURA 4).

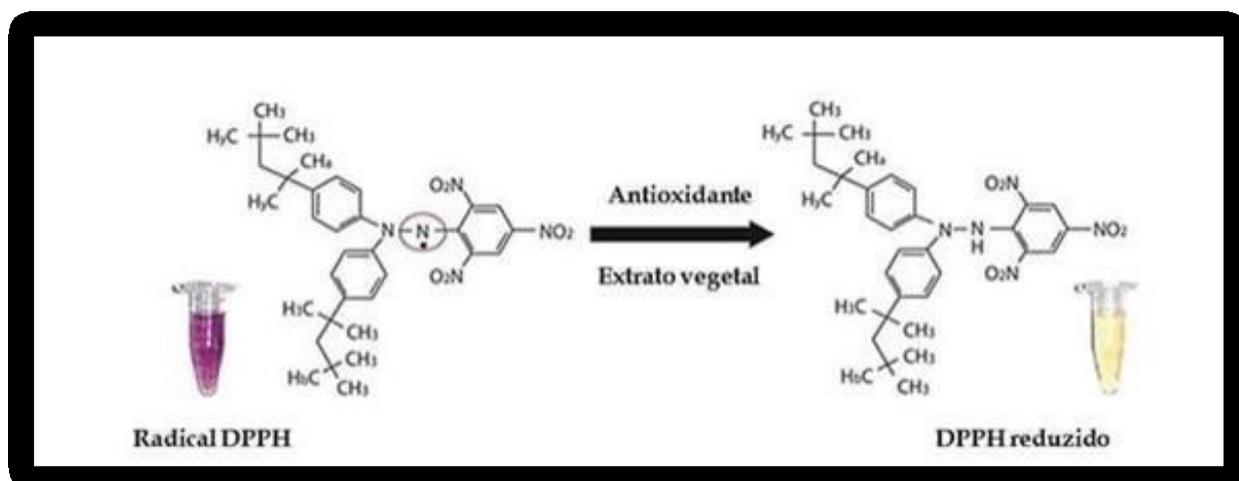


FIGURA 4. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH. A solução do radical DPPH, de coloração roxa, é reduzida por

antioxidantes contidos no extrato vegetal, modificando a coloração da solução de roxo para amarelo. Fonte: PIRES, *et al.*, 2017b.

Por não ser um método específico para determinados tipos de substâncias, serve como um ensaio simples para avaliar o potencial antioxidante total de amostras vegetais sendo amplamente utilizado.

FURLAN *et al.* (2015), em um estudo realizado com *Croton sphaerogynus*, adaptaram o protocolo para ser desenvolvido em microplacas de 96 poços, diminuindo consideravelmente o volume de reagentes e a quantidade de amostra necessária, a qual utilizou-se nesse trabalho.

Para a curva padrão de ácido ascórbico incluiu-se cinco pontos (5, 10, 15, 20 e 25µg/mL), além da concentração zero, três réplicas para cada ponto e descontou-se o valor da absorbância do Branco do ácido ascórbico de cada ponto. A preparação da curva padrão foi necessária para a obtenção da faixa de concentração final na mistura de reação do ácido ascórbico para ser usada como controle positivo.

Dissolveu-se a solução do extrato de *E. hyemale* (0,5 mg/mL) para a realização de cinco pontos (5, 10, 15, 20 e 25µg/mL) do ensaio de DPPH. Toda a solução foi utilizada no mesmo dia.

Preparou-se os volumes de reagentes de acordo com a TABELA 4, incubando-se em microplacas por 30 minutos protegida da luz direta e à temperatura ambiente. Avaliou-se as absorbâncias no espectrofotômetro SpectraMax M5 por meio do SoftMax Pro 6.3 UV/vis a 517 nm. Construiu-se uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão (µg/mL) e os valores de absorbância.

TABELA 4. Volumes das soluções para construção da curva padrão do ensaio de DPPH em microplaca, utilizando o ácido ascórbico.

Concentração final do poço (µg/mL)	Solução DPPH (µL)	Ácido Ascórbico 0.5 mg/mL (µL)	Metanol (µL)	Volume Total (µL)
Branco*	---	---	300	300
0 (Controle de DPPH)**	280	---	20	300
5	280	3	17	300
10	280	6	14	300
15	280	9	11	300
20	280	12	8	300
25	280	15	5	300

Branco ácido ascórbico***	---	***	***	300
------------------------------	-----	-----	-----	-----

* O valor da absorbância do Branco deve ser descontado na absorbância do controle DPPH.

** A concentração 0 também corresponde ao controle de DPPH.

*** Cada ponto da Curva de ácido ascórbico foi feito um branco. Reduziu-se o valor obtido da absorbância do Branco de cada ponto respectivamente, a fim de descontar possíveis interferências de leitura.

Fonte: Adaptado de PIRES *et al.*, 2017b.

Preparou-se em uma microplaca de 96 poços, a mistura do ensaio para cada concentração do extrato da *Equisetum hyemale* seguindo os volumes indicados na TABELA 5. Incubou-se a microplaca por 30 minutos protegida da luz direta, à temperatura ambiente e leu-se no espectrofotômetro SpectraMax M5 por meio do SoftMax Pro 6.3 UV/vis a 517 nm.

TABELA 5. Volumes das soluções para construção da curva do *Equisetum hyemale* de DPPH em microplaca.

Concentração final do poço (µg/mL)	Solução DPPH (µL)	Extrato <i>Equisetum hyemale</i> 0,5 mg/mL (µL)	Metanol (µL)	Volume Total (µL)
Branco*	---	---	300	300
0 (Controle de DPPH)**	280	---	20	300
5	280	3	17	300
10	280	6	14	300
15	280	9	11	300
20	280	12	8	300
25	280	15	5	300
Branco Extrato <i>Equisetum hyemale</i> ***	---	***	***	300

* O valor da absorbância do Branco deve ser descontado na absorbância do controle DPPH.

** A concentração 0 também corresponde ao controle de DPPH.

*** O extrato da *Equisetum hyemale* é rico em pigmento da cor verde interferindo na leitura da adsorbância. Realizou-se um Branco do extrato para cada uma das concentrações utilizadas. Reduziu-se a absorbância do Branco de cada concentração na absorbância respectiva no ensaio de DPPH, a fim de descontar possíveis interferência de leitura.

Fonte: Adaptado de PIRES *et al.*, 2017b.

Após a leitura, realizou-se o cálculo do potencial antioxidante que foi expresso como porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) e EC50.

Para calcular a porcentagem de atividade antioxidante realizou-se o cálculo da %AAO substituindo os valores obtidos nos ensaios na fórmula abaixo.

$$\% \text{ AAO} = \frac{(\text{Abs Controle DPPH} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs Controle DPPH}}$$

Posteriormente, construiu-se uma curva de regressão linear crescente relacionando as concentrações do extrato bruto da planta *Equisetum hyemale* (mg.mL⁻¹) versus aos seus respectivos valores da porcentagem de atividade antioxidante %AAO para determinar o EC50, como feito pelo Mensor et al. (2001). Utilizou-se a curva da %AAO, substituindo-se o Y da equação da reta pela porcentagem de 50%, onde o valor de X corresponde ao EC50 que representa a concentração do extrato efetivo que induz metade (50%) do efeito máximo.

3.3. Modelo Biológico

3.3.1. Modelo Procaríoto

A utilização de bactérias para detectar mutações gênicas é uma importante ferramenta para detectar composto genotóxicos, capazes de causar danos a saúde humana e ambiental (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

Ames, Durston, Yamasaki e Lee descreveram um método utilizando mutantes de *Salmonella enterica sorovar Typhimurium* deficientes da síntese de histidina para detectar o potencial carcinogênico de compostos químicos (AMES *et al.*, 1973).

No entanto, sabe-se que a maior parte dos carcinógenos conhecidos depende de metabolização para apresentar seu potencial de interação com o DNA (CLAXTON, 1997). Portanto, faz-se necessária a utilização de um sistema de metabolização exógena, geralmente, se baseando no uso de frações microssomais hepáticas de ratos (MCCANN *et al.*, 1975).

A utilização de modelos bacterianos para a detecção de mutágenos é recomendada pelo guideline 471, de 17 de julho de 1997, da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD, 1997), que é um órgão não governamental responsável pela normatização de diretrizes de desenvolvimento. Por este motivo foi utilizado a

cepa TA 104 neste experimento. Contudo o guideline 471 foi atualizado em 26 de junho de 2020, não sendo mais recomendado utilizar esta cepa. Este guideline é a diretriz da OCDE para teste de produtos químicos.

3.3.1.1. Linhagens Bacterianas

Devido à rapidez na obtenção de resultados, ampla aceitação e baixo custo, normalmente, o ensaio de mutação reversa bacteriana ou Teste de Ames é o primeiro teste toxicológico utilizado para avaliar se determinados compostos químicos apresentam potencial carcinogênico para mamífero (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Além disto, há uma associação entre um agente ser mutagênico e genotóxico para bactéria e carcinogênico para mamíferos, com uma correlação estimada em 83% (AMES *et al.*, 1973; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Seguindo modificações do método descrito por MARON e AMES (1983), foram utilizadas cinco linhagens do clone LT2 da bactéria *Salmonella enterica* sovar Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104), geneticamente modificadas no óperon da histidina, tornando-as deficiente na síntese do aminoácido histidina (*His-*), essencial para seu crescimento e formação de colônias. Estas cepas, portanto, quando em contato com componentes químicos mutagênicos, são capazes de sofrer novas mutações nestes sítios existentes ou próximo a eles de modo que acarretam à restauração da sua produção de histidina.

Estas cepas com novo fenótipo irão crescer normalmente em meio deficiente de histidina e formar colônias que serão utilizadas na contagem como resultados positivos. Estas cepas utilizadas no teste de Ames têm mutações diferentes em vários *óperons*, e cada uma será responsável para detecção de um tipo de mutação (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Estas cepas então por possuírem diferentes sítios de mutações, possuem diferentes mecanismos de reversão. Suas características estão listadas na TABELA 6.

A cepa TA97 apresenta uma mutação no *locus hisD6610*, identificando substâncias capazes de adicionar uma citosina (par C:G), permanecendo um sítio apurínico/apirimidínico (AP), que posteriormente é preenchida por G, por meio da ativação do reparo por via BER, alterando o quadro de leitura (Frameshit). Desse

modo, a reversão para o genótipo his⁺ na TA97 acontece pela deleção dos pares de base G:C.

Já a mutação induzida na cepa TA98 (deleção de par C:G) está localizada em um *hotspot* (8 repetições C:G) do *locus hisD3052*, importante para a síntese da enzima histidinol desidrogenase e essa mutação detecta compostos mutagênicos capazes de realizar adição ou deleção do pares C:G que ocasiona o deslocamento do quadro de leitura do DNA.

A mutação (substituição do par de base A:T por G:C) no *locus hisG46* da cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese de histidina, por meio da substituição do códon selvagem GGG (CCC) - prolina – por GAC (CAT) – leucina, levando à deficiência na síntese de uma enzima importante na via da histidina. Desta forma, esta cepa detecta agentes mutagênicos que geram substituições, porque a mutação é revertida por mudanças que causam substituição de pares de base, majoritariamente em pares G:C. As características genéticas de cada cepa utilizada estão descritas na TABELA 6.

TABELA 6 - Característica genética das linhagens de *Salmonella* entérica sorovar typhimurium.

	Linhagens				
	TA97	TA98	TA100	TA102	TA104
Gene Mutado	<i>hisD6610</i> <i>his01242</i>	<i>hisD3052</i>	<i>hisG46</i>	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	<i>hisG428</i>
Aminoácido requerido	Histidina Biotina	Histidina Biotina	Histidina Biotina	Histidina	Histidina Biotina
Mutação	<i>rfa</i>	<i>rfa</i>	<i>rfa</i>	<i>Rfa</i>	<i>rfa</i>
Característica	PBL*	PBL	PBL	PBL	PBL
Mutação	<i>uvrB</i>	<i>uvrB</i>	<i>uvrB</i>	-	<i>uvrB</i>
Característica	Sensibilidade à luz <i>uvrB</i>	Sensibilidade à luz <i>uvrB</i>	Sensibilidade à luz <i>uvrB</i>	Resistência à luz <i>uvrA</i> e <i>uvrB</i>	Sensibilidade e à luz <i>uvrB</i>
Plasmídeo	pKM101	pKM101	pKM101	pKM101 pAQ1	pKM101
Característica	Resistência à ampicilina	Resistência à ampicilina	Resistência à ampicilina	Resistência à ampicilina e tetraciclina	Resistência à ampicilina
Tipo de mutação detectada	Deslocamento do quadro de leitura (Frameshift) Adição de G:C.	Deslocamento do quadro de leitura (Frameshift) Adição ou Deleção de G:C.	Substituição de pares de bases G:C por A:T.	Substituição de pares de bases A:T por G:C.	Substituição de pares de bases A:T por G:C.

Legenda: *PBL: perda parcial da barreira de Lipopolissacarídeos. Cada cepa apresenta mutação em loci gênicos diferentes, capazes de detectar diferentes tipos de mutágenos, indutores de alterações no quadro de leitura e substituições.

Fonte: Adaptado de MORTELMANS & ZEIGER, 2000.

Nas cepas TA102 e TA104, o local da mutação *hisG428* apresenta pares de base AT. Na linhagem TA102 a mutação está localizada no plasmídeo pAQ1, conferindo também resistência ao antibiótico Tetraciclina, sendo capaz de detectar mutações por substituição de pares A:T por C:G, todas as outras cepas possuem somente o plasmídeo pKM101, que confere resistência ao antibiótico Ampicilina. Por outro lado, na linhagem TA104 a mutação *hisG428* está inserida no cromossomo bacteriano e pode reverter todas as combinações de pares de bases, por substituição/ transversões de pares de bases A:T por C:G.

Todas as cepas utilizadas (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104) possuem uma mutação no gene *rfa*, importante na síntese de lipopolissacarídeos (LPS), os

quais geram uma perda parcial da barreira da parede celular de bactérias Gram negativas, aumentando a permeabilidade às grandes moléculas.

O plasmídeo pKM101, presente em todas as cepas manuseadas, é utilizado para elevação da sensibilidade bacteriana às possíveis substâncias teste. Visto que aumenta a sensibilidade do sistema na detecção de substâncias mutagênicas, por meio do aumento da via de reparo do DNA propenso a erro (*error-prone repair*) e seleciona bactérias resistentes á ampicilina.

E por fim, a mutação *uvrB* causa a deleção do gene *uvrB* nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA104, levando à deficiência no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos. Esta deleção leva ao aumento da sensibilidade na detecção de vários mutágenos e também gera a deleção do gene responsável pela síntese de biotina, como resultado, as linhagens se tornaram dependentes de biotina

3.3.1.2. Checagem de fenótipos

Para verificar se as cepas utilizadas apresentam as características genéticas específicas que lhes conferem uma maior capacidade de detectar mutágenos, foi realizada uma bateria de testes (cujo nome é checagem de fenótipo bacteriano) capazes de verificar os aspectos fenotípicos das linhagens. Desta forma, os fenótipos das cepas foram confirmados, seguindo as recomendações para análise da integridade genética e, conseqüentemente, do genótipo (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Os procedimentos a seguir foram realizados de acordo com MARON & AMES (1983). As características esperadas de cada cepa utilizada estão dispostas na TABELA 7.

TABELA 7 - Características a serem observadas na checagem de fenótipos das cepas de *S. entérica* sorovar Typhimurium.

Cepa	Mutação		Resistência		Requerimento		Reversão	
	<i>Rfa</i>	<i>uvrB</i>	Ampi ^R	Tetra ^R	<i>His</i>	<i>Bio</i>	[-]	[+]
TA97	+	+	+	-	+	+	80 - 215	>400
TA98	+	+	+	-	+	+	20 - 55	>100
TA100	+	+	+	-	+	+	100 - 240	>500
TA102	+	-	+	+	+	-	100 - 400	>800
TA104	+	+	+	-	+	+	150 - 500	>1000

Legenda: Na Checagem de fenótipos são detectadas características fenotípicas de cada linhagem utilizada no ensaio de mutação reversa bacteriana. As cepas utilizadas foram TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104. As características a serem detectadas são as mutações nos genes *rfa* e *uvrB*, a resistência à ampicilina (Ampi^R) e a tetraciclina (Tetra^R), o requerimento de Histidina (*His*) e Biotina (*Bio*) e as taxas de reversão espontâneas ([-]) e induzida ([+]). (+)=positivo, presença de fenótipo; (-)= negativo, ausência do fenótipo.

Fonte: Adaptado de MARON & AMES, 1983.

Verificaram-se características como: (a) presença de mutação no gene *rfa*, causa a perda parcial da barreira de lipopolisacarídeos, aumentando a permeabilidade da membrana a moléculas de alto peso molecular, que normalmente não atravessariam a parede celular das bactérias; (b) a presença da mutação no gene *uvrB*, provoca a inativação do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que conferia um mecanismo de reparo por meio da resistência à radiação UVB; (c) a presença do plasmídeo pKM101, que confere resistência ao antibiótico ampicilina e aumenta a taxa de reparo propenso a erro (EPR); (d) a presença do plasmídeo pAQ1, que confere a resistência ao antibiótico Tetraciclina e apresenta um domínio extra de mutação da histina; (e) o requerimento de histina e (f) biotina e, por fim, as taxas de mutação (g) espontânea e (h) induzida.

A fim de confirmar a mutação *rfa*, 100 µL das culturas bacterianas crescidas em caldo Lysogenic Broth (LB) a $1-2 \times 10^9$ células/mL foram dispersas em ágar nutriente, utilizando 2 mL de ágar de superfície (7g/L ágar; 5g/L NaCl, 45°C) em meio LB sólido. Após a polimerização do ágar de superfície, posicionou-se um disco

de papel filtro estéril, no centro da placa e sobre ele, adicionou-se 10 µL de solução de cristal violeta a 0,01 %. Incubou-se as placas com cada cepa por 24 horas (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

Para verificar a mutação *uvrB*, realizou-se estrias de cada linhagem em placas contendo meio LB sólido, com auxílio de alças bacteriológicas descartáveis. Metade da placa foi coberta, e a outra metade foi exposta à radiação com luz ultravioleta (UV) em lâmpada germicida de 15 W a distância de 33 cm, por 8 segundos. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Para detectar a resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, colocou-se 100 µL das culturas crescidas em caldo LB a $1-2 \times 10^9$ células/ml, em 10 mL de caldo LB líquido na presença de 31,50 µL de ampicilina (8 mg/mL) e 10 mL de caldo LB líquido na presença de 2,5 µL de tetraciclina (8 mg/mL). Incubou-se as cepas por 72 horas, a 37°C, sob agitação constante.

Para verificar a auxotrofia para histidina e biotina, foi realizada a incubação, uma alíquota das culturas bacterianas crescidas em caldo LB líquido a $1-2 \times 10^9$ células/mL em: (a) ausência dos dois componentes, (b) na presença de histidina (0,1 M) ou (c) biotina (0,5 mM) e (d) na presença de ambos diluídos a 10% em 2 mL de ágar de superfície. O ágar da superfície foi vertido em placas de ágar Vogel_Bonner 10X (10 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 100 g/L $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; 500g/L K_2HPO_4 ; 175 g/L $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$) contendo 20 g/L de glicose (ágar VB - Meio mínimo). Incubou-se as cepas por 72 horas, a 37°C.

Para verificar as taxas de reversão espontânea e induzida, cada linhagem foi incubada a 37°C por 16 horas, em LB com ampicilina (para TA97, TA98, TA100 e TA104) e LB com ampicilina e tetraciclina (para TA102) até atingir a fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ células/mL). Eram colocados, em tubo de ensaio: 100 µL dessa suspensão bacteriana, 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,4) e 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% como controle negativo por ser um composto muito utilizado como solvente aprótico e polar ou um controle positivo que foi diluído em DMSO, específico para cada linhagem (TABELA 8).

TABELA 8 - Controles Positivos no Teste de Ames e na checagem de fenótipos

Cepa	Sem metabolização (-S9)	Com metabolização (+S9)
TA97	4-Nitroquinolina-N-Óxido (CAS: 56-57-5) 1,0 ug/placa	2-Aminoantraceno (CAS: 613-13-8) 1,0 ug/placa
TA98	4-Nitroquinolina-N-Óxido (CAS: 56-57-5) 1,0 ug/placa	2-Aminoantraceno (CAS: 613-13-8) 1,0 ug/placa
TA100	Azida Sódico (CAS: 26628-22-8) 1,0 ug/placa	2-Aminoantraceno (CAS: 613-13-8) 1,0 ug/placa
TA102	Mitomicina C (CAS: 50-07-7) 0,5 ug/placa	Benzeno [a]Pireno (CAS:50-32-8) 50 ug/placa
TA104	Metilmetano sulfonato (CAS: 66-27-3) 50 ug/placa	Benzeno [a]Pireno (CAS:50-32-8) 50 ug/placa

Legenda: Controle positivos (mutágenos) utilizados na checagem de fenótipo. Estão expressos os controles utilizados (nome usual e número CAS) e a dose utilizada, para cada linhagem, na ausência ou presença de metabolização exógena.

Fonte: Adaptado de MORTELMANS & ZEIGER, 2000.

Os tubos foram incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 2 mL de ágar de superfície, contendo solução de histina e biotina(10%) à 45°C foi adicionado no tubo de ensaio e a mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri de ágar Vogel-Bonner. Esta mistura foi incubada a 37°C por 72 horas e as unidades formadoras de colônias (UFC) revertentes *His*⁺ foram contadas manualmente.

3.3.1.3. Metabolização exógena

Algumas substâncias necessitam de ativação metabólica para se tornarem biologicamente ativas. Os sistemas bacterianos não possuem capacidade de metabolização, por isso é necessário que seja adicionado ao ensaio um sistema exógeno de ativação metabólica. Esse sistema, chamado de fração microssomal S9 (S9 mix) foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (Moltox™, USA) e preparada a partir de um homogenato de fígado de ratos machos *Sprague-Dawley* pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254), que estimula a produção de enzimas de metabolização, principalmente CYP2B e CYP1A, podendo levar tanto à inativação quanto à bioativação de xenobióticos, o que dependerá da substância estudada (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Preparou-se o S9 *mix* (4%) conforme recomendado por Maron e Ames (1983), em condições de esterilidade total e em banho de gelo. Para 50 mL de S9 *mix* utilizou-se 5,0 mL de S9 reconstituído (40 mg/mL de proteínas totais) com 2,1 mL de água estéril; 1,0 mL de MgCl₂-KCl (0,15 mol/L, 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1 mol/L, 2,0 mL de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) 0,1 mol/L, 25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L, pH 7,4 e 19,75 mL de água destilada estéril.

3.3.1.4. Ensaio de Mutagenicidade *in vitro* (Teste de Ames)

De acordo com UMBUZEIRO & VARGAS (2003), as doses devem ser selecionadas em concentrações que tenham diferenças de um *log*, sendo a dose máxima recomendada no teste de Ames, 5 mg ou 5000 µg por placa, levando em consideração o limite da solubilidade da amostra-teste. Desta forma, diluiu-se o extrato em 0,9% NaCl nas seguintes concentrações: 0,5; 5; 50; 500 e 5000 µg/placa.

Realizou-se a análise de mutagenicidade e citotoxicidade utilizando modelo procarioto *in vitro*, de acordo com a metodologia proposta por MORTELMANS & ZEIGER (2000), sendo as linhagens selecionadas para o presente projeto: TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 e realizados conforme descrito.

Incubou-se as linhagens bacterianas por 12h-16h à 37°C sob agitação (60rpm) em 10mL de meio caldo LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl) com 31,5µL de ampicilina (8mg/mL) e somente para TA102 foi acrescentado 2,5µL de tetraciclina (8mg/mL) para todas as cepas atinja a fase estacionária de 1-2 x 10⁹ células/mL e serem utilizadas no teste.

Realizou-se o teste de Ames em tubos de ensaio, sendo adicionados 100 µL de cultura bacteriana, 500 µL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, para o ensaio sem ativação metabólica, ou 500 µL de S9 *mix* para o ensaio com ativação metabólica, e 100 µL das concentrações do extrato, controle negativo (NaCl 0,9%) ou controle positivo de acordo com TABELA 8.

Em seguida, pré-incubou-se os tubos de ensaio por 20 min, a 37 °C, com agitação constante. Após esse período foi retirado 10µL e diluídos em solução 0,9% NaCl para serem usados posteriormente no teste de sobrevivência. Adicionou-se 2mL de ágar de superfície (0,7% ágar bacteriológico; 0,5% de NaCl; 10%

biotina/histidina) à 40°C, e a mistura final verteu-se em placa de petri contendo meio ágar Vogel-Bonner (1% ágar bacteriológico; 2% sais de Vogel Bonner; 2% glicose), levando-se à incubação por 72h em estufa à 37°C e as colônias revertentes contabilizadas manualmente (FIGURA 5).

Realizou-se os experimentos em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,01$). As amostras que obtiveram $IM \geq 2$ foram analisadas pelo ensaio correlativo de Bernstein, a fim de se obter a potência mutagênica dos compostos estudados (OECD, 2020; ARAUJO-LIMA *et al.*, 2017).

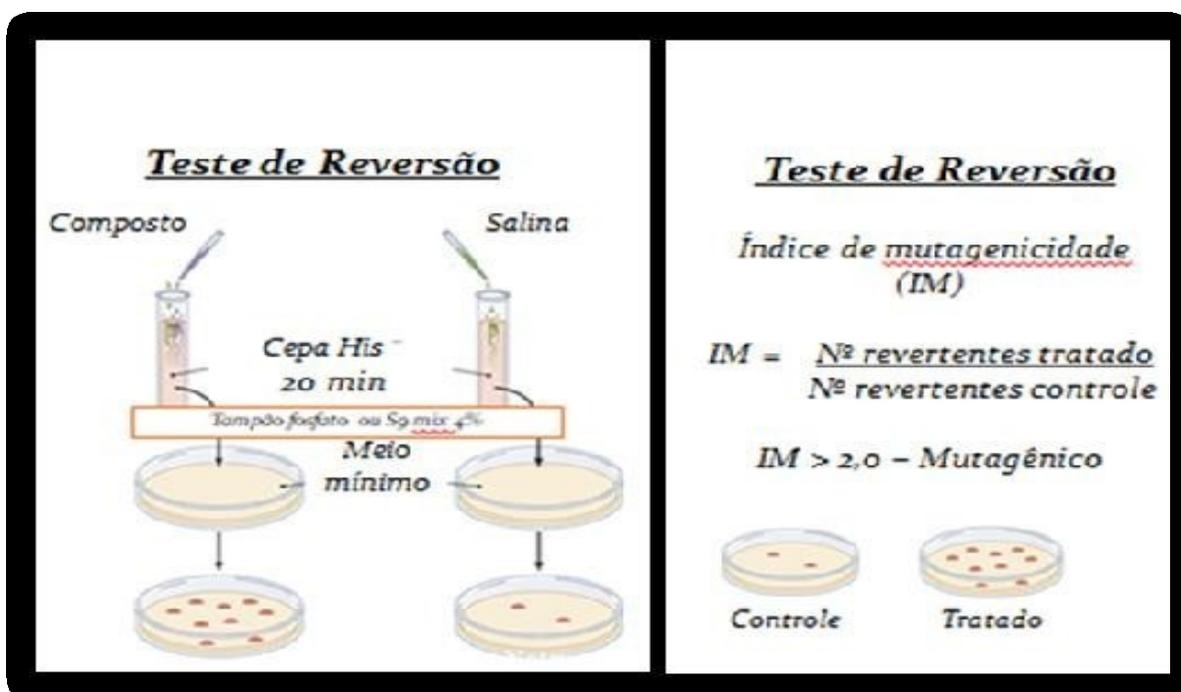


FIGURA 5: Teste de Ames. Legenda: Esquema do Ensaio de Mutagenicidade *in vitro* (Teste de Ames) e o índice de mutagenicidade (IM).

Fonte: ARAUJO-LIMA *et al.*, 2018

3.3.1.5. Ensaio de sobrevivência

Incubou-se para o ensaio de sobrevivência, 100µL da solução contendo bactérias em fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ células/mL), por 20 min à 37°C, em contato com as amostras ou controle negativo ou positivo, nas mesmas condições descritas pelo teste de Ames. Posteriormente, diluiu-se 10µL da mistura teste, utilizando solução 0,9% NaCl, visando a concentração final de $1-2 \times 10^3$ células/mL. Ao final desta etapa, aplicou-se 100 µL desta mistura uma placa de petri contendo meio ágar Louria Bertani sólido (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; 1,5% ágar bacteriológico), sendo espalhados com auxílio de pérolas de vidro, e as placas foram incubadas por 24h em estufa à 37°C.

Após esse período, contabilizaram-se as colônias e o percentual de sobrevivência foi calculado em relação ao controle negativo, sendo considerada concentração tóxica a que apresentou sobrevivência inferior a 70% e diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Para todos os experimentos realizou-se em triplicata e repetidos duas vezes (FIGURA 6).

Analizou-se os resultados por one-way ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,01$) (OECD, 2020; ARAUJO-LIMA *et al.*, 2017; TAVARES, 2021).

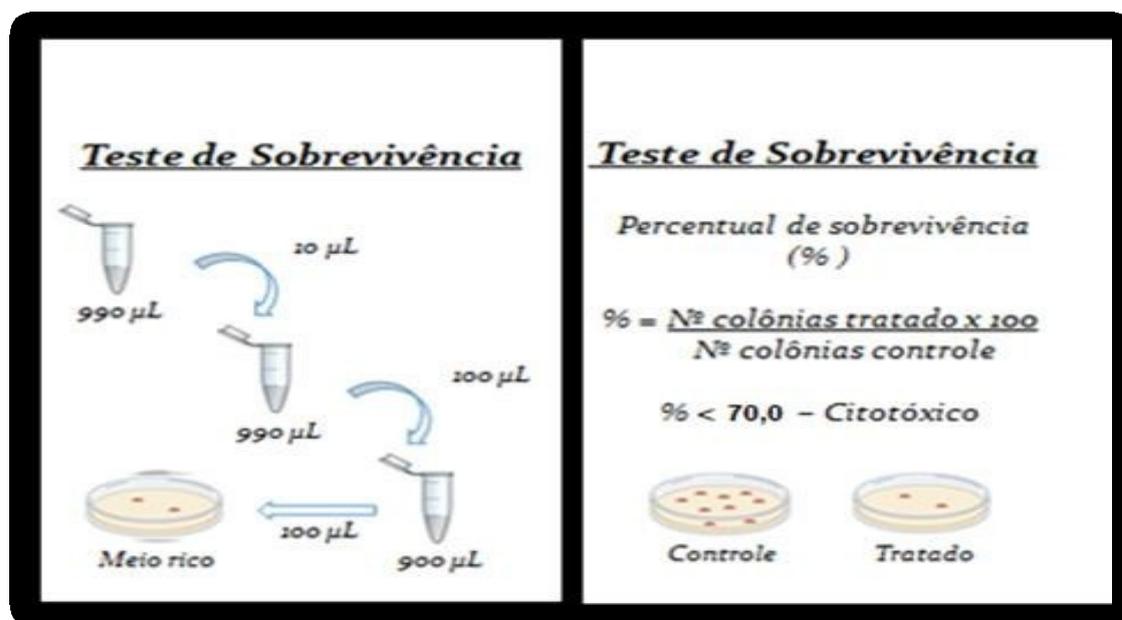


FIGURA 6: Teste de Sobrevivência. Legenda: Esquema do Ensaio de sobrevivência e o percentual de sobrevivência (%).

Fonte: ARAUJO-LIMA *et al.*, 2018

4. RESULTADOS

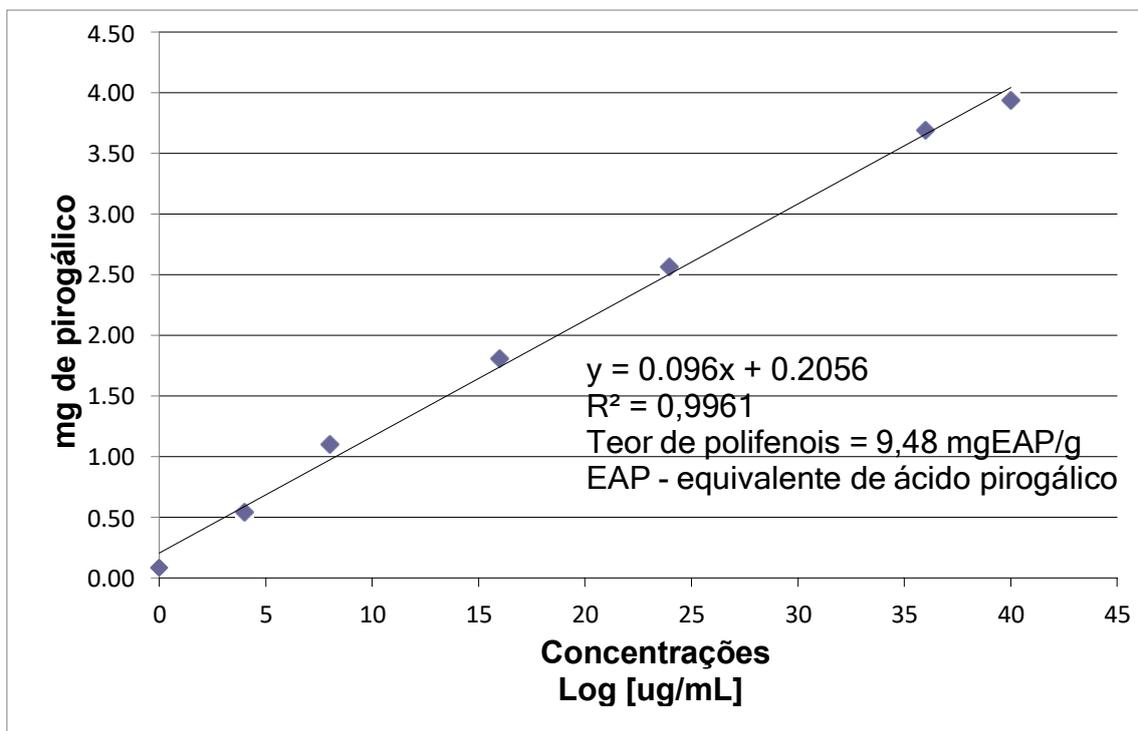
Os resultados exibidos a seguir foram divididos em dois modelos experimentais: (a) modelo não-biológico, que representa as análises fitoquímicas, (b) modelo bacteriano, expressando os resultados de mutagênese e sobrevivência em culturas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Esse conjunto de testes permitiu avaliar a caracterização fitoquímica e a mutagenicidade e genotoxicidade do extrato da planta *Equisetum hyemale*.

4.1. Modelo não-biológico - Análise Fitoquímica

4.1.1. Quantificação de Fenóis Totais – Ensaio de Folin Ciocalteu

Por meio do método de Folin Ciocalteu foram quantificados os compostos fenólicos presentes na amostra de extrato, no GRÁFICO 1 observa-se a curva e a equação da reta obtida na curva de calibração do ácido pirogálico, onde determinou-se a quantidade de compostos fenólicos totais, expresso em mg de EAP/g de amostra. O teor de compostos fenólicos totais encontrado foi de 9,48 mg de EAP /g de amostra.

GRÁFICO 1 - Equação da reta do ensaio de Folin- Ciocalteu



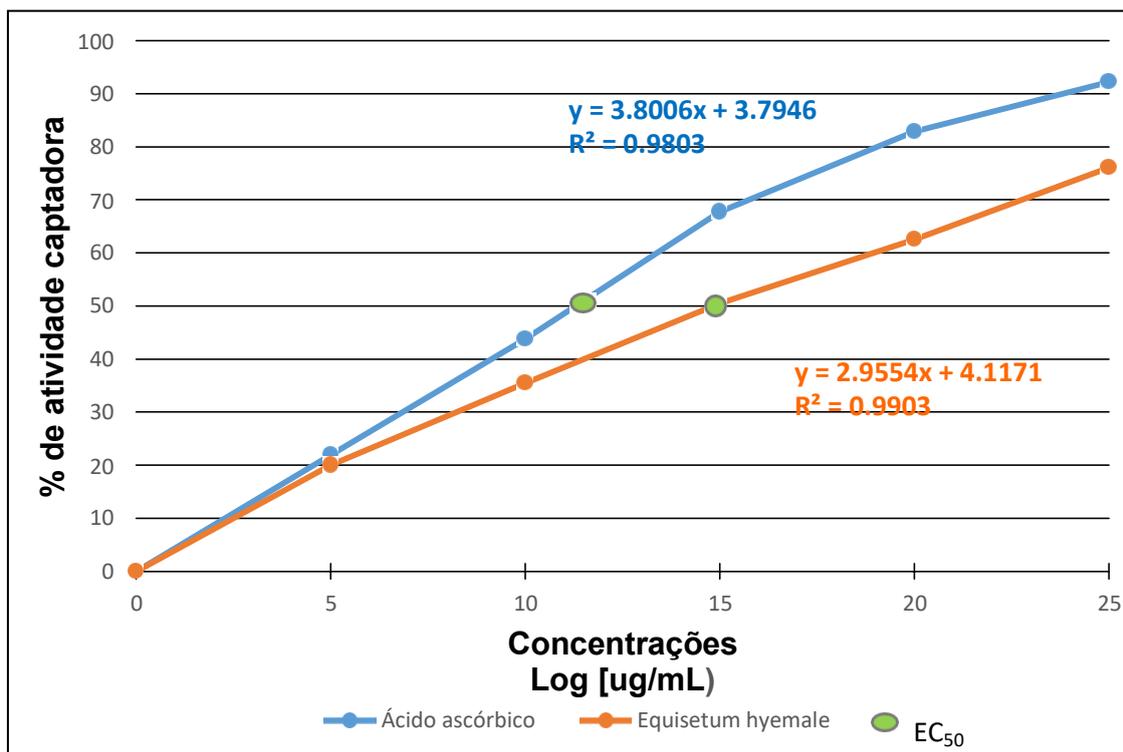
Legenda: Curva padrão de compostos fenólicos presentes no extrato calculadas em mg de ácido pirogálico. As concentrações utilizadas encontram-se em fonte logarítmica para melhor compreensão dos dados coletados.

Fonte: AUTORA, 2020.

4.1.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

Com os resultados obtidos da leitura de absorvância, a capacidade percentual captadora do radical livre foi calculada segundo equação ((Absorbância Negativo - Absorbância Amostra) / (Absorbância Negativo - Absorbância Branco)) x 100 (%). demonstrado no GRÁFICO 2. A partir deles calculou-se o EC50 do ácido ascórbico que foi de 12,16 µg/mL e o EC50 de *E. hyemale* sendo igual à 15,53 µg/mL.

GRÁFICO 2 - Curva de capacidade captadora de radicais livres



Legenda: O ácido ascórbico foi utilizado como controle positiva e apresentou o EC_{50} =12,16 $\mu\text{g/mL}$ e o *E. hymale* apresentou o EC_{50} =15,53 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações utilizadas encontram-se em fonte logarítmica para melhor observação dos dados coletados.

Fonte: A AUTORA, 2020.

4.2. Modelo procarioto

4.2.1. Checagem de genótipos

Para as checagens de genótipos são detectas características fenotípicas em razão dos genótipos (marcas) de cada linhagem utilizada no ensaio de mutação reversa bacteriana. As cepas utilizadas foram TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104.

Primeiramente, verificou-se a presença de mutação no gene *rfa* que causa a perda parcial da barreira de lipopolisacarídeos. Após 24 horas de incubação a 37°C, avaliou-se os resultados, identificando-se a presença de um halo de inibição no centro da placa de aproximadamente 15 mm de diâmetro em todas a cepas portadoras dessa mutação (FIGURA 7).

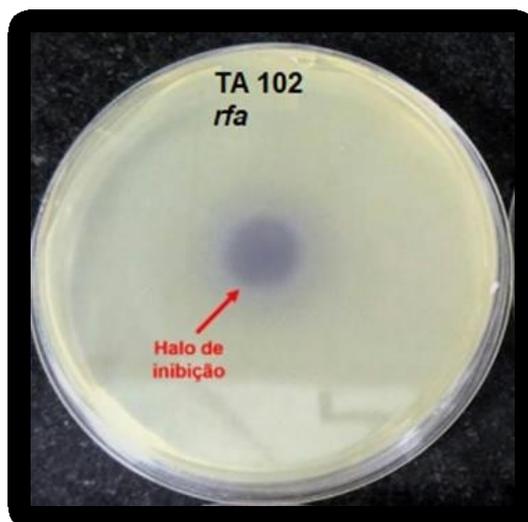


FIGURA 7. Teste de confirmação da mutação *rfa* na linhagem TA 102, mostrando o halo de inibição no local de aplicação do cristal violeta, no centro da placa.

Fonte: A AUTORA (2021).

O segundo experimento foi para checar a presença da mutação *uvrB*. Após incubação a 37°C por 24h, verificou-se a ausência de crescimento das cepas sensíveis ao *uvrB* quando irradiadas por luz ultravioleta, a uma distância de 30 cm e presença de crescimento da cepa resistente ao *uvrB* (TA102) na área irradiada (FIGURA 8).

Portanto, somente a TA102 portadora do sistema de reparo de excisão de nucleotídeos cresceu. Como a mutação de deleção se estende através da região bio-*uvrB* do cromossomo e não pode ser revertida ao tipo selvagem, este método também foi suficiente para mostrar que as cepas são dependentes de biotina para inferir que eles também são defeituosos no mecanismo preciso do reparo do DNA devido à deleção do *uvrB*.

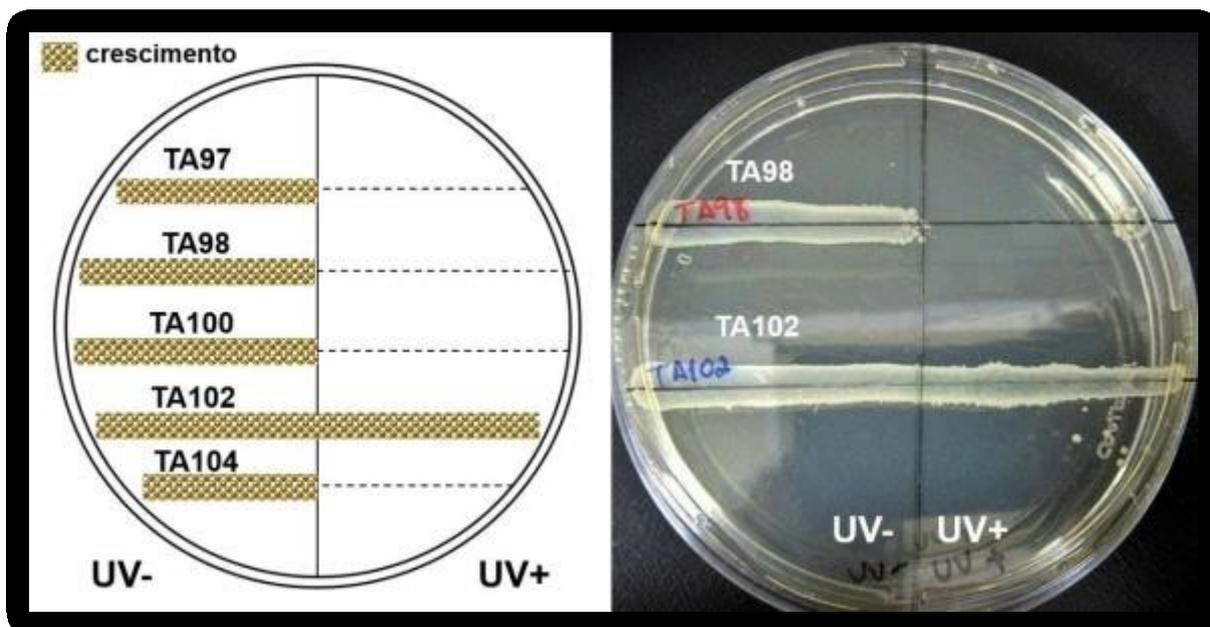


FIGURA 8 – Teste de confirmação da mutação *uvrB*. À esquerda, o padrão de crescimento esperado das linhagens nas áreas não irradiadas (UV-) e irradiadas (UV+). À direita, fotografia de placa de teste *uvrB* para as cepas TA98 e TA102.

Fonte: A AUTORA (2021).

O terceiro experimento foi para detectar a resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina. Todas as cepas testadas (TA97, TA 98, TA100, TA102 e TA104) que continham o plasmídeo pKM-101 cresceram no meio contendo ampicilina. Já em meio contendo tetraciclina o crescimento foi observado somente da linhagem TA 102 que contém o plasmídeo pAQ1.

O quarto experimento foi para verificar a auxotrofia para histidina e biotina. Após a incubação, observou-se o crescimento apenas nas placas que continham histidina e biotina, excetuando-se da cepa TA 102 que cresceu nas placas que continham histidina, sendo ausente a biotina, visto que esta cepa não é auxotrófica para a síntese dessa vitamina.

O quinto e último experimento para avaliar as características fenotípicas foi para verificar as taxas de reversão espontânea e induzida. Os números de colônias revertentes na ausência e na presença dos controles positivos estão dentro da faixa apresentada na TABELA 7.

4.2.2. Ensaio de Mutagenicidade *in vitro* (Teste de Ames) e ensaio de sobrevivência

Foi observado na TABELA 9 que nenhuma concentração testada do extrato aquoso da planta *Equisetum hyemale* foi mutagênica e tóxica na ausência de ativação metabólica (-S9) para as cepas analisadas.

TABELA 9: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do extrato da planta *Equisetum hyemale* no teste de Ames sem ativação metabólica (-S9).

Cepa	<i>Equisetum hyemale</i> µg/ placa	- S9		
		IM	His+ ± DP	Sobr. %
TA97	0	1,0	101,0 ± 9,5	100,00
	0.5	0,8	82,0 ± 2,0	95,00
	5	0,8	83,3 ± 4,2	89,50
	50	0,9	88,0 ± 8,0	88,40
	500	0,9	95,3 ± 8,5	87,90
	5000	0,9	86,0 ± 8,9	86,20
TA98	0	1,0	27,0 ± 2,0	100,00
	0.5	0,8	21,0 ± 1,0	99,30
	5	0,8	22,0 ± 1,0	98,80
	50	0,9	24,0 ± 2,0	98,50
	500	0,9	25,3 ± 1,5	98,30
	5000	1,0	26,7 ± 1,5	97,60
TA100	0	1,0	149,7 ± 12,5	100,00
	0.5	0,9	134,3 ± 9,5	78,20
	5	0,9	130,7 ± 15,3	78,00
	50	0,9	129,3 ± 6,8	77,70
	500	0,9	129,3 ± 17,6	77,50
	5000	0,8	125,3 ± 13,1	76,80
TA102	0	1,0	190,0 ± 4,6	100,00
	0.5	0,9	174,7 ± 9,3	99,90
	5	1,0	185,7 ± 14,0	99,30
	50	1,0	192,7 ± 11,7	98,20
	500	1,0	194,3 ± 13,7	97,50
	5000	1,0	195,3 ± 12,7	97,10
TA104	0	1,0	260,3 ± 18,6	100,00
	0.5	1,2	324,0 ± 17,1	84,00
	5	1,2	325,0 ± 13,2	81,10
	50	1,2	322,7 ± 14,2	78,50
	500	1,3	343,0 ± 12,2	77,90
	5000	1,3	348,0 ± 17,3	77,40

Legenda: Não foram observadas concentrações mutagênicas (IM ≥ 2) ou citotóxicas (sobrevivência ≤ 70%) para as concentrações testadas do extrato da planta *Equisetum hyemale* na ausência de ativação metabólica (S9 mix 4%). Controles positivos sem S9: 4-nitroquinolina-n-óxido a 1,0 µg/placa, para as linhagens TA97 (IM = 2.9), TA98 (IM = 3.01), Azida Sódia (AS) a 1,0 µg/placa para TA100 (IM = 2.05), Mitomicina C (MMC) a 0,5µg/placa para TA102 (IM = 12.60), e metilmetano sulfonato (MMS) 50 µg/placa para TA104 (IM = 3.50).

Fonte: AUTORA, 2020.

No entanto, os dados analisados na TABELA 10 detectaram atividades mutagênicas nas concentrações 500 µg/placa e 5000 µg/placa no tratamento da linhagem TA98, na concentração 500 µg/placa no tratamento da linhagem T100 e na concentração 5000 µg /placa no tratamento da linhagem TA102, na presença de ativação metabólica por S9 mix(+S9). Além disso, a cepa 100 apresentou no ensaio, porcentagem de sobrevivência inferior a 50% na concentração 5000 µg/ placa mostrando uma resposta citotóxica.

O extrato de *Equisetum hyemale* nas concentrações 500 µg g/placa e 5000 µg /placa na presença de ativação metabólica apresentou resposta mutagênica evidenciada na cepa TA 98 que induziu a adição ou deleção dos pares de base G:C.

O extrato de *Equisetum hyemale*, nas concentrações 500 µg g/placa na presença de ativação metabólica apresentou resposta mutagênica evidenciada na cepa TA 100 que induziu uma mutação pontual por substituição de pares de bases, de G:C para T:A. Esta linhagem na concentração 5000 µg/ placa na presença de ativação metabólica não apresentou resposta mutagênica contudo este resultado pode ter sido induzido pela porcentagem de sobrevivência inferior a 50%.

O extrato de *Equisetum hyemale* nas concentrações 5000 µg/placa na presença de ativação metabólica apresentou resposta mutagênica evidenciada na cepa TA 102 que provocou uma mutação pontual por substituição de pares de bases, de G:C para T:A.

TABELA 10: Avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade bacteriana do extrato da planta *Equisetum hyemale* no teste de Ames com ativação metabólica (+S9).

Cepa	<i>Equisetum hyemale</i> µg/ placa	+ S9		
		IM	His+ ± DP	Sobr. %
TA97	0	1,0	191,33 ± 4,16	100,00
	0.5	1,0	191,33 ± 18,15	86,49
	5	1,1	212 ± 12,49	85,89
	50	1,2	227 ± 12,73	90,09
	500	1,1	204,67 ± 7,57	93,09
	5000	1,0	199,33 ± 23,86	90,09
TA98	0	1,0	40,67 ± 1,15	100,00
	0.5	1,4	55,33 ± 2,31	100,00
	5	1,4	57,33 ± 8,08	100,00
	50	1,9	75,33 ± 13,01	100,00
	500	2,1	84 ± 15.10*	93,87
	5000	3,1	125.33 ± 11.37*	80,41
TA100	0	1,0	96.67 ± 14.05	100,00
	0.5	1,2	113.33 ± 7.02	86,31
	5	1,4	138.67 ± 20.82	80,05
	50	1,9	183.33 ± 5.03	75,88
	500	3,2	312 ± 59.63*	75,61
	5000	0,3	28 ± 6.00	47,39
TA102	0	1,0	190,0 ± 6.36	100,00
	0.5	1,3	174.7 ± 72	100,00
	5	1,5	320 ± 39.60	99,40
	50	1,5	328 ± 22.62	100,80
	500	1,7	376 ± 21,16	100,00
	5000	2,0	448 ± 90.51*	100,00
TA104	0	1,0	307.33 ± 4.04	100,00
	0.5	1,0	317.33 ± 20.13	100,00
	5	1,1	344 ± 49.96	100,00
	50	1,2	378.66 ± 36.07	100,00
	500	1,3	413.33 ± 30.29	100,00
	5000	1,6	382.67 ± 25.72	100,00

Legenda: Foram observadas concentrações mutagênicas (IM ≥ 2) para as concentrações testadas do extrato da planta *Equisetum hyemale* com ativação metabólica (S9 mix 4%) nas cepas TA98, TA100 e TA102 e concentrações citotóxica (sobrevivência ≤ 70%) na cepa TA100. Controle positivo com S9: 2-aminoantraceno (2AA) a 1,0 µg/placa, para as linhagens TA97 (IM =18.30), TA98 (IM = 4.10) e TA100 (IM = 17.70) e, e Benzo[a]pireno (B{a}P) a 50µg/placa para TA102 (IM =3.60), e TA104 (IM = 6.70). *p≤0,01 **Destaque em vermelho indica as concentrações que apresentaram mutagenicidade e citotoxicidade.**

Fonte: AUTORA, 2020.

5. DISCUSSÃO

A escolha da metodologia de avaliação *in vitro* da toxicidade aplicada nessa dissertação foi baseada em recomendações feitas por agências reguladoras internacionais, como o FDA e a OECD para a testagem de plantas com potencial farmacológico, antes do estabelecimento dos ensaios pré-clínicos envolvendo experimentação animal. O uso racional de metodologias *in vitro* reduz os gastos e minimiza o uso de animais de experimentação.

O método usado para a quantificação de fenóis totais foi o Ensaio de Folin Ciocalteu, por ser um dos testes mais aceito e utilizado para avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra. Este ensaio é utilizado rotineiramente no estudo de antioxidantes fenólicos, uma vez que se estabelece uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais. Funciona medindo a quantidade de substância analisada necessária para inibir a oxidação do reativo.

A importância de determinar compostos fenólicos em plantas está diretamente relacionada ao potencial antioxidante destes compostos e aos benefícios relacionados à ingestão de plantas ricas nesses compostos.

O método de avaliação da atividade antioxidante direta pelo sequestro do radical DPPH foi aplicado por se tratar de um método rápido e eficaz para detecção de espécies químicas capazes de reduzir radicais livres diretamente, sem a influência de respostas metabólicas, por meio de propriedades químicas sequestrantes de algumas estruturas.

O uso do modelo de mutação reversa bacteriana (Teste de Ames) é recomendado pela comunidade científica e é obrigatório para a avaliação da segurança de um fármaco, pois é fundamental para a detecção de possíveis carcinógenos, já que existe uma alta correlação entre os índices de mutagenicidade detectados nesse modelo e o risco relativo de carcinogenicidade de compostos.

5.1. Amostra e modelo não biológico

As concentrações do extrato da *E. hyemale* foram diluídas em água destilada nos ensaios de Quantificação de Fenóis Totais e de Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH.

A presença de metabólicos secundários nas plantas apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, entre outras. O metabólico secundário mais abundante em planta terrestre são os compostos fenólicos. 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.

Já existem vários estudos que indica que várias plantas utilizadas em infusão “chá” possuem atividades antioxidantes. Os componentes fenólicos contribuem principalmente para a atividade antioxidante dessas plantas. A *Camellia sinensis* é uma planta rica em compostos fenólicos antioxidantes, responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana. Sendo utilizada para a fabricação do chá verde e do chá preto. Em estudos realizados por PEREIRA et al. (2009) foi analisado quatro amostra comercial de chá verde que apresentaram teores de fenóis totais que variaram de 4,8±0,1 a 26,60±0,56 mg de EAP /g de amostra e três amostra comercial de chá preto que apresentaram teores de fenóis totais que variaram de 17,73 ± 1,14 a 23,33 ± 0,55 mg de EAP /g de amostra. Estas concentrações de polifenóis possuíram valores próximo ao encontrado na amostra da *Equisetum hyemale* que foi de 9,48 mg de EAP /g de amostra.

Portanto, o total de fenóis totais da *Equisetum hyemale* está de acordo com o padrão de compostos fenólicos encontrados em plantas medicinais. Conclui-se que a concentração encontrada é potencialmente antioxidante.

O método do DPPH utiliza o valor de IC₅₀ que responde 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. A planta *E. hyemale* apresentou o valor de IC₅₀ em 15,53 µg/mL. A capacidade antioxidante dos vegetais está estreitamente relacionada com a presença de compostos fenólicos. A literatura sugere que a cavalinha pode ser

utilizada como antioxidante natural, com base nos seus compostos fitoquímicos (BLUMENTHAL et al., 2000).

5.2. Modelo biológico

As linhagens bacterianas de *Salmonella* entérica sorovar *Typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 foram utilizadas nos ensaios para detecção da mutagenicidade e citotoxicidade, devido à sua alta sensibilidade para vários tipos de mutágenos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

As concentrações testadas foram definidas de modo a detectar possíveis efeitos mutagênicos e citotóxicos em diferentes ordens de grandeza, com valores intermediários. A recomendação da OECD é que se utilize como limite de dose o valor de 5000 µg/placa, ou 5mM ou ainda o limite de solubilidade da amostra.

No caso, a dose limite utilizada foi de 5000 µg/ placa sendo diluído em um log sequencialmente até a concentração e 0,5 µg/ placa. Desta forma as seguintes concentrações de 5000, 500, 50, 5 e 0,5 µg/ placa foram testadas na ausência e na presença de metabolização exógena.

O extrato da planta *Equisetum hyemale* não apresentou nenhum resultado citotóxico ou mutagênico nas concentrações testadas na ausência de ativação metabólica (-S9). Não foram observadas elevações nas taxas de reversão nem declínios no percentual de sobrevivência das cinco cepas utilizadas, o que sugere que o extrato parece ser inerte às interações com o DNA bacteriano na ausência de metabolização exógena.

Contudo na presença de ativação metabólica (S9), os resultados sugerem efeitos citotóxicos e mutagênicos no extrato da planta *Equisetum hyemale*. Nas seguintes linhagens:

A linhagem TA98 sugere que o extrato de *Equisetum hyemale* nas concentrações 500 µg /placa e 5000 µg /placa na presença de ativação metabólica provocou a adição ou deleção dos pares de base G:C. Sugere-se que a partir da concentração de 500 µg /placa, na presença de metabolização, induz a resposta mutagênica que é acarretada pelo deslocamento do quadro de leitura do DNA.

Este resultado não foi observado na linhagem TA97 sendo possível deduzir que as substâncias presentes da planta *E. hymale*, na presença de metabolização,

apresentaram limitações na sua capacidade de adicionar uma citosina (par C:G), não sendo possível a ativação do reparo por via BER, por isso não há alteração no quadro de leitura.

A análise dos resultados obtidos em experimentos com a linhagem TA100 sugere que o extrato de *Equisetum hyemale* nas concentrações 500 µg/placa na presença de ativação metabólica provocou uma mutação pontual por substituição de pares de bases, de G:C para T:A. Esta linhagem na concentração 5000 µg/ placa na presença de ativação metabólica não apresentou resposta mutagênica contudo este resultado pode ter sido induzido pela porcentagem de sobrevivência inferior a 50%. Sugere-se que na concentração de 5000 µg/ placa os danos por substituição de pares de bases causaram danos irreparáveis que levam ao colapso da célula bacteriana.

A análise dos resultados obtidos em experimentos com a linhagem TA102 sugere que o extrato de *Equisetum hyemale* na concentração 5000 µg g/placa na presença de ativação metabólica provocou uma mutação pontual por substituição de pares de bases, de G:C para T:A. Este fato sugere que nesta concentração provoca a inativação do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Apesar da cepa TA 102 ser a única linhagem bacteriana utilizada cujo gene *uvrB* não foi deletado.

Este resultado não foi observado na linhagem TA 104 que apresenta a mutação hisG428 que está inserida no cromossomo bacteriano e pode reverter todas as combinações de pares de bases, por substituição/ transversões de pares de bases A:T por C:G.

6. CONCLUSÃO

Apreciando os objetivos propostos neste projeto e analisando-se os resultados obtidos, foi possível adquirir as seguintes conclusões:

Nos ensaios fitoquímicos foi realizado a quantificação de fenóis totais pelo Ensaio de Folin Ciocalteu, sendo encontrada quantidade de compostos fenólicos no extrato aquoso de *Equisetum hyemale* possibilitando testar a sua capacidade antioxidante por meio do teste de sequestro de radical livre apresentando potencial antioxidante.

As metodologias *in vitro* empregadas demonstraram que nenhuma concentração testada do extrato aquoso da *E. hyemale* foi mutagênica e tóxica na ausência de ativação metabólica (-S9) e as concentrações até 50 µg/ placa não foram capazes de induzir a mutação reversa bacteriana e a citotoxicidade nas linhagens bacterianas utilizadas na presença de ativação metabólica por S9 mix(+S9).

Conclui-se, portanto, que os resultados dos experimentos realizados na *E. hyemale* constituíram um importante passo para estabelecer a dose diária máxima recomendada que seja eficaz e segura nas indicações terapêuticas utilizadas na medicina popular.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; ZUO, Y.; LU, X.; ANWAR, F. ; HMAEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. *Food Chemistry*, v. 190, p. 80-89, 2016.

ALVES C.Q.; DAVID J.M.; DAVID J.P.; BAHIA M.V.; AGUIAR R.M. Métodos para determinação da atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10): p. 2202-2210, 2010.

ALVES, C. F. S.; BONEZ, P. C.; EBLING, M. S.; CASAGRANDE, C.; FREITAS, L.; DOLWITSCH, C.; PIRES, F.; SAGRILLO, M. R., BRUM G. F; CAMPOS, M. M. A.; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial, cyto and genotoxic activities of *Equisetum hyemale*. *Pharmacognosy Journal*, v.11, n.6, p. 1563-1571, 2019.

AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.70, n.8, p. 2281-2285, 1973.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boletim Informativo - Fitoterápicos, Edição n.64 p. 6-8, novembro de 2006.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. janeiro de 2013.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.. Memento Fitoterápico: Farmacopéia Brasileira. Brasília, DF, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos. 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Consolidado_fitoterapicos_2018.pdf/a2f53581-43e5-47bb-8731-99d739114e10. Pdf. Acesso em: 26 de dezembro 2020.

ARAUJO-LIMA, C.F.; NUNES R.J.M.; CARPES R.M.; AIUB C.A.F.; FELZENSZWALB I. Pharmacokinetic and toxicological evaluation of a zinc gluconate-based chemical sterilant using *in vitro* and *in silico* approaches. *BioMed Research International*, 2017.

ARAUJO-LIMA, C. F.; SOEIRO, M. N. C.; Felzenszwalb, I. Estudo da eficácia e segurança de compostos heterocíclicos no contexto da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e na prevenção de danos ao DNA. 2018. Tese (Doutorado em Biociências) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

ARAUJO-LIMA, C. F.; Israel FELZENSZWALB, I.; MACEDO, A. F. *Cyrtopodium glutiniferum*, an Example of Orchid Used in Folk Medicine: Phytochemical and Biological Aspects. *Orchids Phytochemistry. Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*, Springer International Publishing, p. 1-16, 2020.

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

BARRETTO, A. C. P.; SANTELLO, J. L.; (2002) Manual de hipertensão: entre a evidência e a prática clínica. São Paulo: Lemos Editorial.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, V.127 p. 617-633, 1994 Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x> Acesso em: 20 jan. 2020.

BERG, J. M. T. E.; LUBERT, J. (2008), Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p.

BERTALOT, M. J. A.; CARVALHO-PUPATTO J. G. RODRIGUES E. M.; MENDES, R. D.; BUSO, D. Controle alternativo de doenças no morango. Associação Brasileira de Agricultura Biodinâmica, 2010.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG.; A, BRINCKMANN, J. Herbal medicine: expanded commission e monographs. In: Integrative Medicine Communications, 1 st Ed. Newton, MA, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC N°10, de Março de 2010. Notificações de Drogas Vegetais junto à ANVISA. Brasília, DF, 21 mar. 2010.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Plantas Medicinais e Fitoterápicos. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2011. 71 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.190 p.

BROUDISCOU, L. P.; LASSALAS, B. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 431-40, 2000.

CARNEIRO, D. M.; FREIRE, R. C.; HONÓRIO, T. C. D; ZOGHAIB, I.; CARDOSO, F. F. S. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; SOUSA, A. L. L.; JARDIM, P. C. B. V.; CUNHA, L. C. Randomized, double-blind clinical trial to assess the acute diuretic effect of *Equisetum arvense* (Field Horsetail) in healthy volunteers. Evidence based complementary and alternative medicines, v. 1, p. 1-8, 2014.

CHINSAMY, M.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. South African Journal of Botany, v. 91, p. 88-98, 2014.

CLAXTON, L. D. The development, validation and analysis of *Salmonella* mutagenicity the methods for environmental situation. In: Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice, 1997.

COSTA SANTOS, P. M. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFGRS/Ed. da UFSC, 2007. p. 724.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. Revista Virtual de Química, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

DE QUEIROZ, G. M.; POLITI, F. A. S.; RODRIGUES, E. R.; SOUZA-MOREIRA, T. M., MOREIRA, R. R. D.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C.; PIETRO, R. C. L. R. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. Journal of Medicinal Food, v. 18, n. 7, p. 830-834, 2015.

D'AGOSTINHO, M.; DINI, A.; PIZZA, C., SENATORE, F., AQUINO, R. Sterols from *Equisetum arvense*. Bollettino della Societa Italiano di Biologia Sperimentale, 30;60 (12), p. 2241-2245, 1984. Pubmed; PMID: 6529502.

EMA - European Medicines Agency - Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). *Equisetum arvense* L., herba. 2009. Disponível em: < [ment_library/Herbal_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018411.pdf](http://www.ema.europa.eu/med/medlib/Herbal_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018411.pdf) >. Acesso em: 27 abr. 2020.

Farmacopéia Portuguesa VIII: edição oficial / [Comissão da Farmacopeia Portuguesa]. - 1ª ed. - Lisboa: Infarmed, 2005.

FELZENSZWALB, I.; et al. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: a potential superfruit to be considered. *Food and Chemical Toxicology*, 58: p. 536-544, 2013.

FERRAZ, M.; PEREIRA, A.; LOPES, M.; FERNANDES, M. Avaliação das Possibilidades de aplicação na regeneração Óssea. Universidade Fernando Pessoa. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 5. Porto, p. 136-145. 2008. ISSN 1646-0480.

FERREIRA, I.; CHICOUREL, J.L.; LEMOS, L.; SILVA G.R. Caracterização morfo-histológica para a "cavalinha" (*Equisetum giganteum* L.) / Morpho-histological characterization to "cavalinha" (*Equisetum giganteum* L.) *Rev. ciênc. farm.* 20(1), p. 51-7, 1999. illus.

FURLAN C.M., SANTOS K.P., SEDANO-PARTIDA M.D., MOTTA L.B., SANTOS D.Y.A.C., SALATINO M.L.F., NEGRI G., BERRY P.E., VAN EE B.W., SALATINO A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 38: p. 693-702, 2015.

GALVÃO, B. V. D.; ARAUJO-LIMA, C. F.; DOS SANTOS, M. C. P.; SELJAN, M. P.; CARRÃO-DANTAS, E. AIUB, C. A. F.; CAMERON, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; GONCALVES, E. C. B. A.; FELZENSZWALB, I. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis, *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier, p. 114217, 2021.

GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V.; RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 6, n. 29, p. 1-19, 2010.

GOLLO, A. L.; TANOBE, V. O. A.; DE MELO PEREIRA, G. V.; MARIN, O.; BONATTO, S. J. R.; SILVA, S.; BARROS, I. R. B.; SOCCOL, C. R. Phytochemical analysis and biological activities of *in vitro* cultured *Nidularium procerum*, a bromeliad vulnerable to extinction. *Scientific Reports*, 10, 7008 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64026-z>

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, R. S.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. Introdução à genética. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS, Capítulo 1, p. 13-26, 2001.

GUIMARÃES, S. S.; PADILHA, T. R.; JUNIOR, A. W.; MAZARO, S. M. Atividade Fungistática “In Vitro” de Extratos de Cavalinha *Equisetum* spp. In: I CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA UTFPR – Campus Dois Vizinhos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 96, no. 2-3, p. 67-202, 2002.

Herbário Jepson – Universidade da Califórnia, Berkeley, 2021 Disponível em: <https://ucjeps.berkeley.edu/eflora/eflora_display.php?tid=50315>. Acesso em: 15 jan. 2021.

HOLZHUTER, G.; NARAYANAN, K.; GERBER, T. Structure of sílica in *Equisetum arvense*. Anal Department of physics, Universit Rostock, Germany. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. p. 512-517, 2003. DOI: 10.1007/s00216-003-1905-2.

HONGXIA, L.; 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, I. 2, 21, p. 322-327, 2012.

HUANG, D.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IKAWA M., SCHAPER T.D.: DOLLARD C.A.: SASNER J.J. 2003. Utilization of Folin Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. F. Chem.* 51, 1811-1815.

IRONDI, E. A.; OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolics composition and antidiabetic property of *Brachystegia eurycoma* seed flour in high-fat diet, low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. v.5, p.159-165, 2015.

KLASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)*. 2ª Edição. Editora McGraw-Hill. 2012, 472p.

KAZYIAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpes vírus suíno e bovino. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, p. 522-528, 2012.

KIRKLAND, D.; ZEIGER, E.; MADIA, F.; GOODERHAM, N.; KASPER, P.; LYNCH, A.; MORITA, T.; OUEDRAOGO, G.; MORTE, J. M. P.; PFUHLER, S.; ROGIERS, V.; SCHULZ, M.; THYBAUD, V.; BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WORTH, A.; CORVI, R. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutation Research*. 775-776, p. 55-68, 2014.

LANGHAMMER, A. J.; NILSEN, O. G. In vitro Inhibition of Human CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 by Six Herbs Commonly Used in Pregnancy. *Phytotherapy Research*, v. 28, p. 603- 610, 2014.

LANSDOWN, R.V. 2014. *Equisetum hyemale*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2014: e.T203003A42381564. Disponível em:

<<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T203003A42381564.en.> >

Downloaded on 25 January 2021.

LORENZI H.; MATTOS J. F. A. *Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas*. 2ª. Editora Plantarum, 2006, 544p.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. v. 113, p.173-215, 1983.

MARTINS, ER et al. *Plantas Medicinais*. Viçosa, Editora UFV, 2000, p. 219.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I.C.F.R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and post-harvest conditions: a review. *Food Chemistry*, v.211: p.41-50, 2016.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella / micrososome test. Assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 72 p. 5135-5139, 1975.

Medicinal plants in the Republic of Korea (ISBN 92 9061 120 0), WHO Regional Publications, Western Pacific Series No. 21, WHO Regional Office for the Western Pacific, Manila, 1998.

MELLO, M.; BUDEL, J. M. *Equisetum* L. (Equisetaceae): Uma revisão. *Cadernos da Escola de Saúde* v.9, p. 1 – 15, 2014.

MEYER, L.; QUADRO, K. E. D.; ZENI, A. L. B. Etnobotânica na comunidade de Santa Bárbara, Ascurra, 10: p. 258-266, 2012.

MOLYNEUX, P. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2004, 26, 211.

MONTE, F. H. M.; SANTOS, J. G.; MARCELA, B. M.; DAMASSENSO, M. F.; LEAL, L. K. A. M. Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties in vitro. Pharmacology Biochemistry and Behavior. v. 81, n. 3, p. 593- 600, 2005.

MORTELMANS, K.; ZEIGER E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research. 2000; 455: p. 29-60.

MORTELMANS, K. 2019. A perspective on the development of the Ames *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity assay. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019; 841: p. 14-16.

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

NIKLAS K. J. Safety factors in vertical stems – evidence from *Equisetum hyemale*. Evolution. v.43, p. 1625-1639, 1989.

OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Organisation for Economic Co-operation and Development publishing, n. July, p.1-11, Paris, France, 1997.

OECD, *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development publishing Publishing, Section 4, June, 2020, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo, 2014.

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

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, v.165, p. 496- 500, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIN, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BACHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais de antioxidantes. *Química Nova*. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J, CASTRO, C. V, VILELA, G.P.F, ESTEVES, S, CAMARGO, A A, CARVALHO, T. C. A, JORGE, C. O. A, OLIVEIRA, D. L. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry *BMC Complementary and Alternative Medicine*. V13, p. 208, 2013.

OLSEN, S. *Encyclopedia of Garden Ferns*, 1^o ed, Timber Press. p.1410-1411, 2007.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, v.74, p. 10-36, 2015.

PARK, E. Y.; JEON, H. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Equisetum hyemale*. *Natural product sciences*, v. 14, p. 239- 243, 2008.

PEREIRA, A.V.; ALMEIDA, T.C.; BELTRAME, F.L.; COSTA, M.E.; GARRIDO, L.H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 31, n. 2, p. 119-124, 2009.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do FolinCiocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017a.

PIRES, J., TORRES, P.B., SANTOS, D.Y.A.C., CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017b.

RADULOVIC, N.; STOJANOVIC, G.; PALIC, R. Composition and Antimicrobial Activity of *Equisetum arvense* L. Essential Oil. *Phytotherapy Research*, v. 20, p. 85-88, 2006.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.11, n.2, p.57-69, 2001. Disponível em: <<http://www.farmacognosia.ufpr.br>>. Acesso em: 27 jul. 2019.

REUTER, C.; GARCIA, S. C. Protocolo de fitoterapia na Hipertensão Arterial Sistêmica dos Municípios da BP3, 2010. Disponível em: <<http://www.gege.agrarias.ufpr.br/plantastoxicadas/arquivos/equisetum%20giganteum.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2020.

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*. v.99, p. 253-257, 2005.

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

SAPEI, L.; NÖSKE, R.; STRAUCH, P.; PARIS, O. Isolation of mesoporous biogenic silica from the perennial plant *Equisetum hyemale*. *Chemistry of Materials*, v.20, n.5 p. 2020-2025, 2008.

SCHENKEL E.P.; GOSMANN G. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007. p. 724.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, v.18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v.18, p. 757-781, 2015.

SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO J.; BETA, T. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.) *Journal of Cereal Science*, v. 59, p. 211-218, 2014.

SILVA, W.; CARMO, D. R. Comportamento Volumétrico do Ácido Ascórbico em presença da erva *Equisetum arvense*. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, curso de agronomia, UNESP, São Paulo, p. 4486 – 4489, 2009.

SILVA, I. A. A.; SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A., QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS J. S.; SOLEDADE, L. E. B.; LIMA E. O.; SOUZA, A. L.; SOUZA, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil *Food Chemistry*, v. 141, n.4, p. 3552-3558, 2013.

SILVA, P. M., GAUCHE, C., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C., FETT, R. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, v.196, p. 309-323. 2016.

SINGLETON V. & ROSSI J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: p. 144-158.

SPONCHIADO, G et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*. 178, p. 289-296, 2016.

SOLEIMANI, S.; AZARBAIZANI, F. F.; NEJATI, V. The effect of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) in histological changes of pancreatic beta-cells in streptozotocin-induced diabetic in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 10, n. 23, p. 4236 - 4240, 2008.

TAOFIQ, O.; CALHELHA, R. C.; HELENO, S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; SANTOS-BUELGA, C.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*. v. 76, p. 821-827, 2015.

TAVARES, G. D. B.; AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I.; DANTAS, E. K. C.; ARAÚJO-LIMA, C. F.; SIQUEIRA JÚNIOR, C. L.; In vitro biochemical characterization and genotoxicity assessment of *Sapindus saponaria* seed extract, *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier, v. 276, p.114170, 2021.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) com indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. [Mutagenicity test of *Salmonella typhimurium* (Ames test) as potential carcinogenicity indicator in mammals]. In: L.R. Ribeiro, D.M.F., Salvadori, E. K. Marques, (Orgs.) *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, 356p.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28, p.519-28, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 27 jul. 2020.

VEIT, M.; BECKERT, C.; HOHNE, C.; BAUER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*. v.38, p. 881-891, 1995.

WAGNER, P.; KOLTER, R. Economic and Medicinal Plant Research. San Diego: Academic Press, 1990.

WATERMAN P. G.; MOLE S. Extraction and chemical quantification. In: Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 83-85, 1994.

WICHTL, M.; CRYGAN, F. C.; FROHNE, D.; HILLER, K.; HÖLTZEL, C.; NAGELL, A.; PACHALY, P.; PFÂNDER, H. J.; WILLUHN, G.; BUFF, W. Herbal drug and phytopharmaceuticals. Editora Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Alemanha, p.188-191, 1994.

WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification. Academic Press: Encyclopedia of Evolutionary Biology. Ed. 1, 2016, 2132p.

WIJESEKERA, R. C. B. The Medicinal Plant Industry, SCR Press, London, 1991.

YAMANAKA, S.; SATO, K.; FUYU ITO, F.; KOMATSUBARA, S.; OHATA, H.; YOSHINO, K. Roles of silica and lignin in horsetail (*Equisetum hyemale*), with special reference to mechanical properties. Journal of Applied Physics.V.111, P.044703, 2012.