

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE CAVALINHA PARA FINS MEDICINAIS

OBTAINING AND CHARACTERIZING GROSS EXTRACT OF CAVALINHA FOR MEDICAL PURPOSES

Tábada Maria Sales Pereira tabadamaria@hotmail.com

Graduada em Química com atribuições tecnológicas pela Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

Alexandro da Silva Abreu alexandrosilvaabreu@gmail.com

Mestrando em Química pela Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto/Brasil).

Janicy Arantes Carvalho janicyjun@gmail.com

Mestranda em Química pela Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto/Brasil).

Ana Valéria de Moraes avaleriamoraes@gmail.com

Mestre em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

Cristina Pacheco Soares cpssoares@univap.br

Doutora em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Rio de Janeiro/Brasil). Professora na Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

Milton Beltrame Junior beltrame@univap.br

Doutor em Química pela Universidade de São Paulo (São Paulo/Brasil). Professor e diretor da Faculdade de Educação e Artes (FEA) na Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

Kumiko Koibuchi Sakane kumiko@univap.br

Doutora em Física pelo Instituto Tecnológico de Aeronáutica (São José dos Campos/Brasil). Professora na Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

Andreza Ribeiro Simioni simioni@univap.br

Doutora em Química pela Universidade de São Paulo (São Paulo/Brasil). Professora e Coordenadora do Programa de Mestrado Profissional em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba (São José dos Campos/Brasil).

RT&T | a. 10 | n. 2 | p. 75-92 | jul./dez. 2019

Recebido em: 20 de outubro de 2017 | Aprovado em: 20 de março de 2018

Sistema de Avaliação: Double Blind Review | DOI: <https://doi.org/10.25112/rtt.v10i2.1965>

RESUMO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo. A cavalinha, pertencente à família Equisetaceae, é amplamente distribuída na região sul do Brasil. Possui propriedades medicinais, tais como diurética, hemostática, anti-inflamatória, cicatrizante, dentre outros princípios ativos intrínsecos. O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de extratos brutos da planta *Equisetum hyemale* por uso de dois métodos extrativos diferentes, a caracterização dos extratos por meio de suas propriedades e potencialidades medicinais e avaliação do efeito da temperatura em ambos os extratos. Os resultados permitiram a comparação de ambos os métodos extrativos, por influência térmica (Soxhlet) e influência química (Maceração), utilizando técnicas como espectroscopia no Uv-visível e na região do Infravermelho, que permitiram a quantificação de clorofila e da atividade antioxidante. O cultivo celular em monocamadas como modelo biológico permitiu avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos. Tendo em vista a carência de pesquisas científicas sobre o mecanismo de extração de ativos de origem vegetal, este trabalho contribui para a área de produtos naturais, os quais são utilizados para a melhoria da qualidade de vida.

Palavras-chave: Extração. Caracterização. Cavalinha.

ABSTRACT

The use of medicinal plants for the treatment of diseases is associated with folk medicine from different parts of the world. The "cavalinha", belonging to the family Equisetaceae, is widely distributed in southern Brazil. It has medicinal properties such as diuretic, hemostatic, anti-inflammatory, healing, among other intrinsic active ingredients. The objective of the present work was to obtain crude extracts from the *Equisetum hyemale* plant by using two different extractive methods, the characterization of the extracts by their medicinal properties and potentialities and the evaluation of the temperature effect on both extracts. The results allowed the comparison of both extractive methods, by thermal influence (Soxhlet) and chemical influence (Maceration), using techniques such as UV-visible and Infrared spectroscopy, which allowed the quantification of chlorophyll and antioxidant activity. Cell culture in monolayers as a biological model allowed to evaluate the cytotoxicity of crude extracts. Given the lack of scientific research on the mechanism of extraction of plant-based assets, this work contributes to the area of natural products, which are used to improve the quality of life.

Keywords: Extraction. Characterization. Cavalinha.

1 INTRODUÇÃO

Algumas plantas se apresentam resistentes a diferentes agentes desencadeadores de doenças como fungos e bactérias. Essa resistência pode estar relacionada a substâncias presentes em sua estrutura natural.

A determinação do potencial biológico da planta *Equisetum hyemale*, conhecida popularmente como Cavalinha, poderá favorecer a sua aplicação em métodos alternativos e economicamente viáveis para um possível futuro controle de doenças em seres humanos utilizando o extrato desta planta como tratamento terapêutico.

A Cavalinha é conhecida por ser uma erva de consumo popular, sendo assim, de fácil acesso aos consumidores. O presente trabalho busca identificar benefícios para o uso da Cavalinha com fins medicinais, contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas na área de extração de ativos de origem vegetal, pouco explorada até o presente momento.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Algumas plantas se apresentam resistentes a diferentes agentes desencadeadores de doenças como fungos e bactérias. Essa resistência pode estar relacionada a substâncias presentes em sua estrutura natural (VENTUROSOSO,2010).

A determinação do potencial biológico da planta *Equisetum hyemale*, conhecida popularmente como Cavalinha, poderá favorecer a sua aplicação em métodos alternativos e economicamente viáveis para um possível futuro controle de doenças em seres humanos utilizando o extrato desta planta como tratamento terapêutico (GUIMARÃES, 2011). Estudos revelam que a Cavalinha apresenta grande potencial no combate de doenças como diabetes, infecções na bexiga e garganta, cálculo renal, pressão alta, próstata e vesícula (BASTTITI, 2013).

A Cavalinha, também conhecida como: rabo-de-cavalo, erva-canudo, lixa-vegetal entre outros; pertence à família *Equisetaceae*. A espécie *Equisetum hyemale* L. (*Equisetaceae*) é considerada uma planta medicinal usada na forma de chás para combater doenças infecciosas ou inflamatórias, apresentando vários compostos relacionados a essas ações (QUEIROZ, 2015).

As plantas medicinais representam uma importante área para a saúde, bem como um componente econômico, além de agregar a conservação e uso sustentável da biodiversidade (SANTOS, 2017). Informações sobre o conhecimento tradicional ou medicinal dessas plantas e seus usos representam um papel vital na descoberta de novos produtos de origem vegetal para aplicação na saúde humana (CALIXTO, 2019).

Mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico presente atualmente, diversas culturas, provenientes dos mais distintos lugares, ainda conhecem e fazem uso do potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças. Este tipo de prática acompanha o homem desde a pré-história e tem evoluído junto a ele ao longo dos anos (FABRI, 2011).

Já foram comprovadas diversas propriedades medicinais da *Equisitum hyemale* e outras plantas da mesma família apresentam características próximas às suas, sendo um exemplo a Cavalinha da espécie *Equisitum arvense* (NAKATA, 2018) que apresenta poder antioxidante, estimulando o desenvolvimento de pesquisas que possam vir a comprovar demais benefícios da *Equisitum hyemale* ainda não explorados.

O termo extração denomina a retirada de algo da forma seletiva e completa. Quando aplicada a área de pesquisas que envolvem matéria prima vegetal, o termo extração implica na obtenção de substâncias ou fração ativa contida num dado vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos que sejam tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (MIYAKE, 2006).

Extratos vegetais são misturas complexas constituídas, na maioria das vezes, por diversas classes de substâncias químicas de origem natural, que contém em sua composição diferentes grupos funcionais (ATANASOV, 2015). O processo de separação de um mais constituintes bioativos de extratos naturais é composto por três fases principais: extração a partir da matéria vegetal, fracionamento do extrato ou óleo e purificação do princípio ativo (ALTEMIM, 2017). Atualmente já são comprovados a viabilidade de diversos métodos de extração que possibilitam extrair de plantas componentes estruturais responsáveis por lhes conferir propriedades medicinais que são de grande interesse antrópico (MIYAKE, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção de extratos brutos da planta *Equisitum hyemale* por uso de dois métodos extrativos diferentes, caracterizar o extrato por meio de suas propriedades e potencialidades medicinais e avaliar o efeito da temperatura em ambos extratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal, ou seja, a planta *Equisitum hyemale* empregada neste processo, da marca *Chinatown*, foi adquirida em casas de produtos naturais, sendo que, cada pacote contém 20 g da planta triturada e seca.

Para esta pesquisa foi feito uso de 4 (quatro) pacotes da planta, totalizando 80 g que foram divididas em duas porções de 40 g. Para a execução de dois métodos de extração, a frio e a quente de acordo com a Figura 1.

Figura 1 - Planta seca e separada para cada tipo de extração.



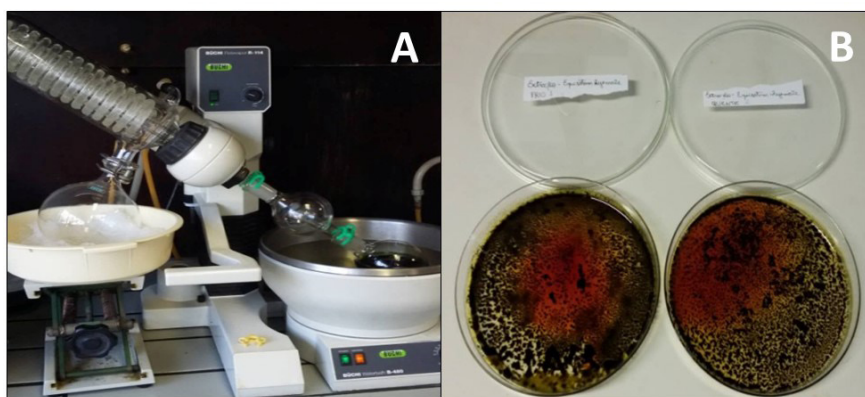
Fonte - Os autores.

O extrato bruto obtido por maceração foi preparado utilizando frasco âmbar fechado hermeticamente por um período de 7 dias sem iluminação. As porções da planta foram mantidas sob imersão em metanol PA durante 48 horas na proporção de 1:1 (m/v) segundo a metodologia descrita por Santos e colaboradores (2016).

Para elaboração do extrato bruto obtido por Soxhlet foi observado a limpidez do solvente extrator (metanol), em um período de aproximadamente 8 horas de extração segundo a metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2016).

Para a obtenção do extrato seco, o volume total de cada extrato foi exatamente medido e transferido para erlenmeyer, previamente tarados e então, concentrados por evaporação a pressão elevada em um Rotaevaporador Buchi R-114. O extrato concentrado foi transferido para placas de Petri e secos em estufas a 40 °C (Figura 2b).

Figura 2 - (A) Rotaevaporador utilizado para concentrar os extratos; (B) extratos brutos secos.



Fonte - Os autores.

Para análise da clorofila presente nos extratos, as amostras foram caracterizadas por espectroscopia de absorção no Uv-Visível (Lambda20 da Perkin Elmer-IP&D-UNIVAP) na faixa de 400 a 800 nm.

Para determinação do potencial antioxidante, o potencial de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos foi analisado espectrofotometricamente a 515 nm conforme metodologia descrita por Mensor e colaboradores (2001).

Pó seco de cada extrato vegetal foi utilizado para as análises de FTIR (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier). 10 mg do extrato seco em pó foi encapsulado em 100 mg de pastilha de KBr, a fim de preparar discos de amostra translúcidos. A amostra de cada um dos extratos foi carregada no espectrofotômetro (Spectrum Spotlight 400 FT-IR da Perkin Elmer), com uma faixa de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo teste do MTT, que consiste na degradação de sal MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]) em cristais de formazan pelas mitocôndrias conforme descrito por Mosmann (1983). Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas. As células utilizadas neste estudo foram fibroblasto de camundongo L-929 (ATCC CCL23). Culturas de monocamada de L-929 foram cultivadas em meio Dupleco Eagle (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina e 1% penicilina-estreptomicina (Gibco). As células foram utilizadas na fase logarítmica de crescimento e mantido a 37 °C estufas com 5% CO_2 e 95% de ar.

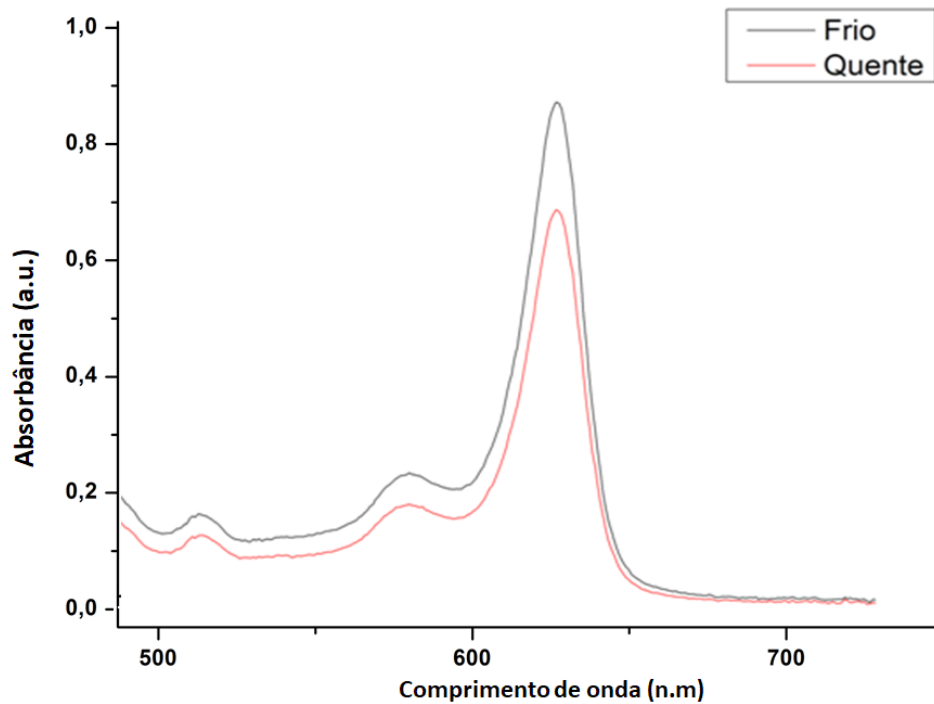
Para o presente ensaio foram plaqueadas aproximadamente 10^5 células/poço em placa de 24 poços. As células utilizadas foram mantidas em meio de cultura e incubadas em três diferentes concentrações (0,250; 0,500 e 1000 mg). A estas células foi adicionada uma solução de MTT na concentração de 1 mg/mL. A cultura foi conduzida à incubadora por 4 horas. Após o período de incubação, as células foram removidas da estufa de CO_2 e os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos pela adição de isopropanol. A absorbância foi determinada por espectrofotômetro com filtro de 570 nm.

Após incubação foi realizada a avaliação da viabilidade celular dos extratos e os dados foram apresentados em formato de média \pm desvio padrão, e os testes estatísticos aplicados foram o ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A presença de clorofilas nos extratos brutos foi medida diretamente por espectroscopia no UV-Vis. Pela análise dos espectros de absorção, o pico máximo de absorção está localizado na região de 660 nm, correspondendo à absorção da clorofila presente no extrato (Figura 3).

Figura 3 - Espectro de absorção dos extratos a quente e a frio.



Fonte - Os autores.

Os ensaios espectrofotométricos envolvem a resolução de equações simultâneas em que as concentrações desconhecidas de pigmento são modeladas em função da absorbância medida nos comprimentos de onda de pico específicos do pigmento (PORRA, 2006).

A quantificação de clorofila A e B presente em cada um dos extratos brutos foi realizada utilizando as seguintes equações conforme descrito por Rajalakshmi (2015):

$$\text{Clorofila a: } 12.7(A_{663}) - 2.69(A_{645})$$

$$\text{Clorofila b: } 22.9(A_{645}) - 4.68(A_{663})$$

onde, os comprimentos de onda de 663 e 645 nm, são correspondentes para as clorofilas A e B, respectivamente.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- quantificação das clorofilas tipo A e B presentes nos extratos.

-	Extração a frio	Extração a quente
Abs ₆₆₃	0,339752138	0,217200637
Abs ₆₄₅	0,665558279	0,378074080
Clorofila A (mg Clorofila/g folha)	1,2451	1,4103
Clorofila B (mg Clorofila/ g folha)	0,7133	0,8085

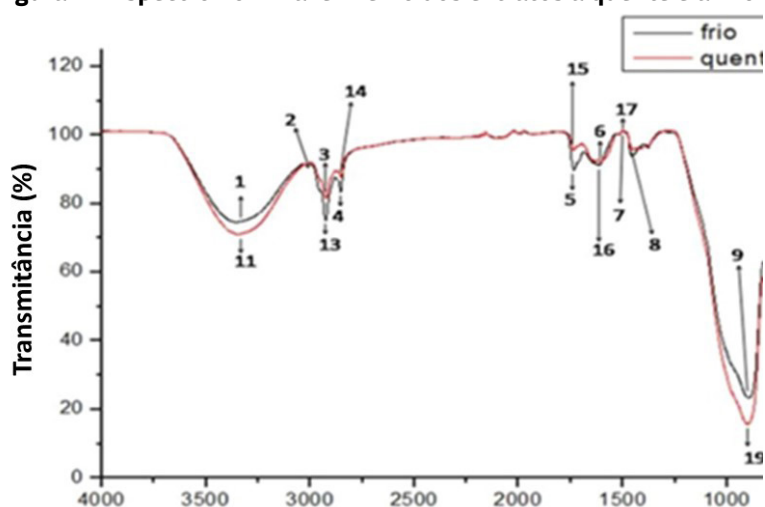
Fonte - Os autores.

Os verdes são fontes importantes de alimentos protetores que são altamente benéficos para a manutenção de uma boa saúde e prevenção de doenças. Neste estudo, os extratos brutos obtidos da planta *Equisetum hyemale* foram usadas para estimar o teor de clorofila presente.

A espectroscopia no UV-visível demonstrou que o extrato a quente tem absorvância menor que o extrato a frio na região de 660 nm, que corresponde a absorvância da clorofila presente na amostra (LICHTENTHAL, 2001), o que se comprova a partir de cálculos de quantificação da clorofila, onde o extrato a quente tem maior concentração das clorofilas tipo A e B do que o extrato a frio, o que possivelmente pode ser atribuído ao aquecimento da extração. A diminuição da quantidade de clorofila com aquecimento pode ser atribuída a degradação da clorofila por via enzimática por ação da clorofilase, que atua preferencialmente em temperaturas mais elevadas (40 °C-60 °C) (FANG, 1998).

A Figura 4 ilustra o espectro no Infravermelho para ambos os métodos extrativos.

Figura 4 - Espectro no infravermelho dos extratos a quente e a frio.



Fonte - Os autores.

As bandas identificadas em cada amostra são exibidas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2 - Bandas identificadas no espectro de FTIR da amostra por extração a frio.

Nº da Banda da amostra de Extração a Frio	Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição aproximada
1	3352	ν da ligação O-H e da ligação N-H
2	3011	ν da ligação O-H e da ligação N-H
3	2925	ν_{ass} da ligação C-H no grupo -CH ₂
4	2854	ν_s da ligação C-H no grupo -CH ₂
5	1736	ν da ligação C=O no grupo éster: pectina
6	1614	ν de anel aromático: lignina
7	1455	δ_{ass} da ligação C-H no grupo -CH ₃
		δ_s da ligação C-H no grupo -CH ₂
8	1398	δ_s da ligação C-H no grupo -CH ₃
9	898	Arabinose
10	759	Deformação do CH ₂ do grupo etila

Tabela 3 - Bandas identificadas no espectro de FTIR da amostra por extração a quente.

Nº da Banda da amostra de Extração a Quente	Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição aproximada
11	3352	ν da ligação O-H e da ligação N-H
12	-----	-----
13	2924	ν_{ass} da ligação C-H no grupo -CH ₂
14	2852	ν_{s} da ligação C-H no grupo -CH ₂
15	1735	ν da ligação C=O no grupo éster: pectina
16	1603	ν de anel aromático: lignina
17	1455	δ_{ass} da ligação C-H no grupo -CH ₃
		δ_{s} da ligação C-H no grupo -CH ₂
18	-----	-----
19	900	Arabinose
20	762	Deformação do CH ₂ do grupo etila

Essas bandas eram: 3352 cm⁻¹ (grupos OH) (BARUD, 2013), 2924 cm⁻¹ (ν CH₂ alifático), 1735 cm⁻¹ (principalmente devido a C = C e C = O), 1603 cm⁻¹ (vibrações CH e aromáticas), 1455 cm⁻¹ (ν CH₃ alifático) (OLIVEIRA, 2016), 1398 cm⁻¹ (provavelmente relacionadas ao CO de polióis) e 900 cm⁻¹ pode ser devido à vibração do anel aromático (SHARAF, 2013) ou ao metanol (GUTIERREZ-GONÇALVES, 2009). Além das bandas descritas anteriormente, outras bandas foram encontradas, porém não foram identificadas.

Após a atribuição de bandas na espectroscopia no IV foi possível observar uma intensidade menor de bandas nas amostras que receberam o aquecimento (extração por Soxhlet), sugerindo estrutura desordenada pelo efeito de temperatura e alterações das intensidades das bandas indicando diminuição da quantidade de biomoléculas que constituem a planta. Buitrago e colaboradores (2016) demonstraram que o estresse de temperatura causou mudanças significativas nos espectros de infravermelho das plantas (duas espécies de plantas (*Fagus sylvatica* e *Rhododendron cf. catawbiense*))

Para o teste de viabilidade celular, as células foram plaqueadas aproximadamente 10^5 células/poço em placa de 24 poços. As células L-929 (fibroblasto de camundongo - ATCC CCL23) utilizadas foram mantidas em meio de cultura e incubadas com 160 mg de cada tipo de extrato que foram divididos em três diferentes concentrações (0,250; 0,500 e 1000 mg) dissolvidos em 1mL de DMSO por 24 e 48 horas segundo a metodologia descrita por Ogbole e colaboradores (2017).

O ensaio colorimétrico de MTT é um método sensível, quantitativo e confiável que mede a viabilidade celular. O ensaio baseia-se na ação da enzima desidrogenase mitocondrial,

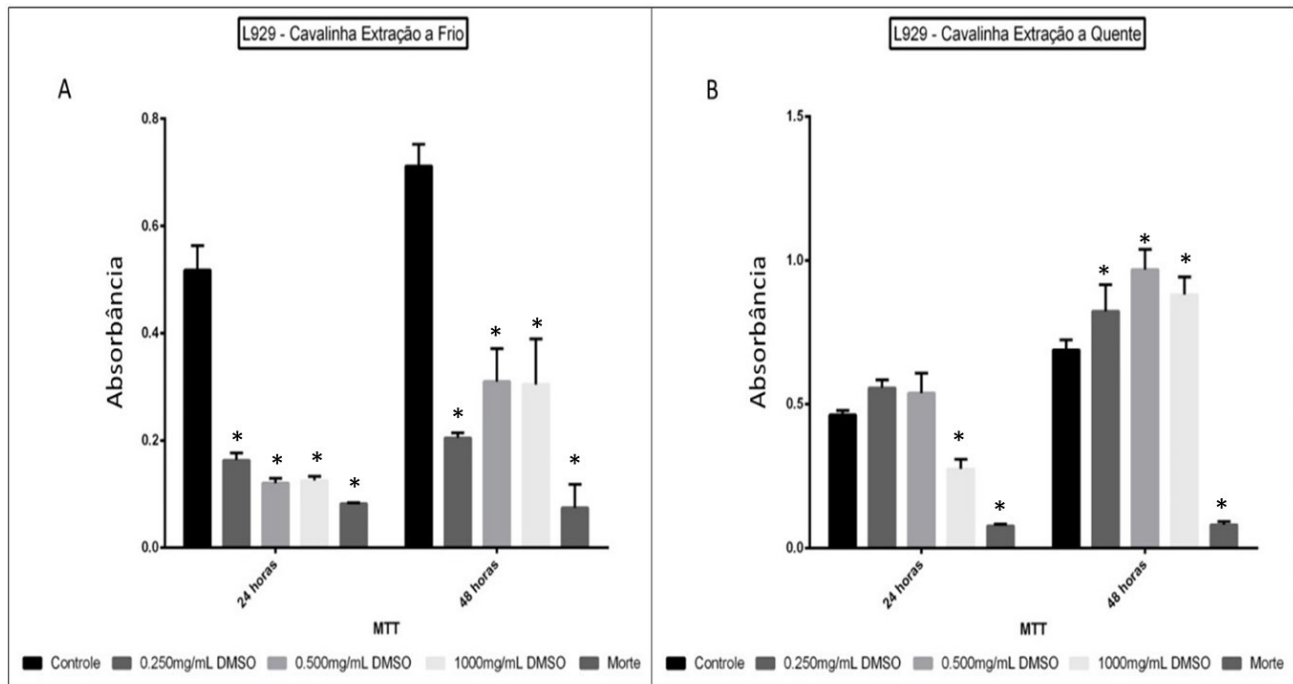
presente apenas em células metabolicamente viáveis, que clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul

escuro/roxo, chamado de formazan, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (RISS, 2016).

Os testes de toxicidade permitem verificar a segurança do uso de produtos naturais, representando assim um importante fase no processo de obtenção de compostos farmacologicamente ativos. O teste de citotoxicidade *in vitro* é um teste de avaliação preliminar que pode discriminar espécies vegetais e seus compostos derivados que realmente produzem benefícios para a saúde do ser humano (NGUTAA, 2012).

Após incubação foi realizada a avaliação da viabilidade celular dos extratos e os dados foram apresentados em formato de média \pm desvio padrão, e os testes estatísticos aplicados foram o ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no ensaio do MTT. A Figuras 5A e 5B mostra o resultado do teste de MTT para o extrato a frio e a quente, respectivamente.

Figura 5 - viabilidade celular para os extratos a frio (A) e quente (B) com 24 e 48 horas de incubação.



Fonte - Os autores.

Observa-se que no teste de MTT da extração a frio (Figura 5A), no período de 24 e 48 horas há uma diferença entre o controle e as concentrações do extrato bruto, onde na concentração de 1000 mg/mL teve maior citotoxicidade.

Queiroz e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da citotoxicidade extratos metanólicos de *E. hyemale* foram utilizando linhagem celulares de fibroblastos de córnea de coelho (SIRC,CCL-60) e macrófagos murinos (J774) na faixa de concentração de 2000 µg/mL até 15.65 µg/mL. Os autores observaram que o extrato metanólico foi citotóxico nesse intervalo de concentração para ambas as células.

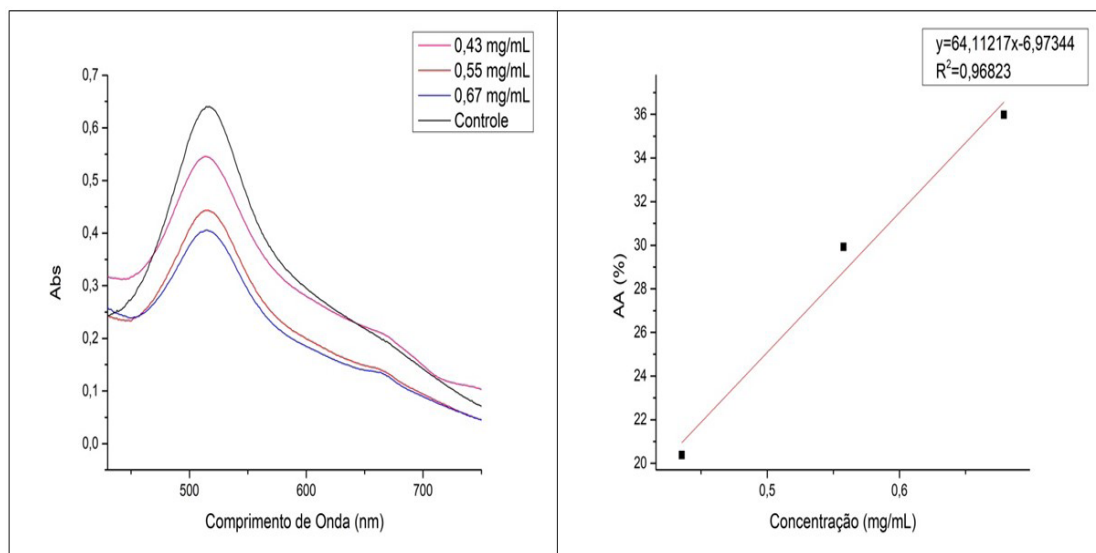
Na extração a quente, no período de 24 horas a maioria das concentrações não apresentam diferença significativa já em 48 horas apresentam diferença significativa, contudo não apresentou citotoxicidade. Este fator pode estar correlacionado a degradação pela temperatura de substâncias ativas existentes no extrato bruto, uma vez que o efeito térmico também gerou alterações no espectro de absorbância no UV-vis, na quantificação de clorofila e no espectro de IV, sendo um indício de que há princípios ativos na planta que são sensíveis a ação da temperatura, o que pode culminar com perda na sua atividade.

Sulaiman e colaboradores (2017) avaliaram a influência dos parâmetros de extração, como a temperaturas (60–80 ° C) na extração de compostos fenólicos na planta *Clinacanthus nutans*. Os autores relatam que com um tempo de extração prolongado a 80 ° C, ocorre diminuição no rendimento da extração porque a alta temperatura causa a oxidação e degradação dos compostos desejados.

A avaliação da atividade antioxidante se dá através do monitoramento do consumo do radical livre DPPH pelas alíquotas de ensaio das amostras, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 515 nm. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, onde é observada a redução da absorbância até sua estabilização.

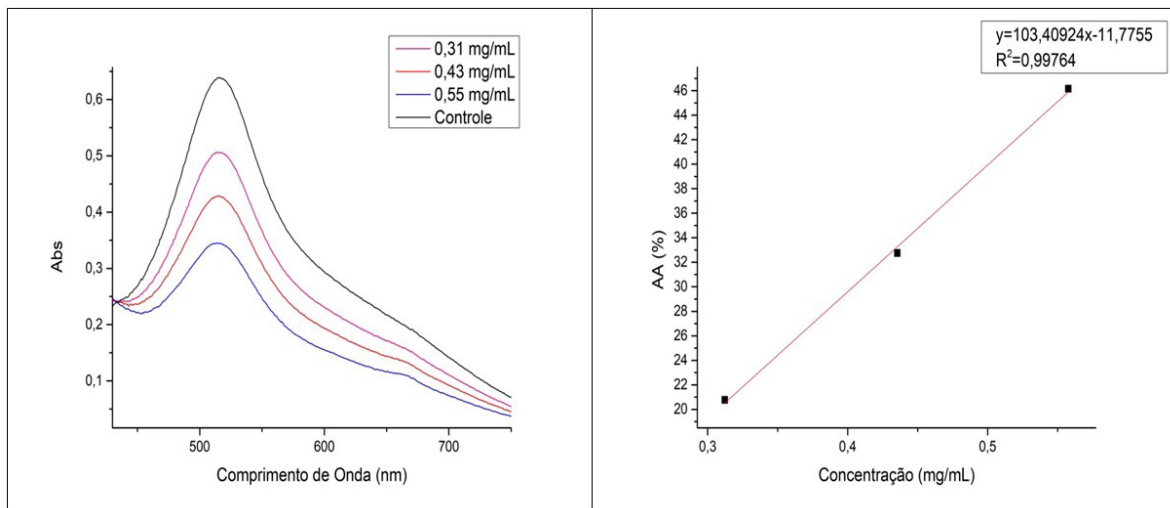
A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados dos testes que são diretamente proporcionais à concentração do analito. Análises de regressão linear foram realizadas pela plotagem da atividade antioxidante - AA% versus concentração de extrato bruto ($\mu\text{g}/\text{mL}$). A faixa de linearidade satisfatória (0.43-0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para extrato a quente e 0.31-0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para extrato a frio) foi detectada por métodos espectrofotométricos (Uv-visível). A regressão por mínimos quadrados para o método espectrofotométrico mostrou coeficientes de correlação: $r = 0,96823$ para o extrato a quente e $r = 0.99764$ para o extrato a frio. As figuras 6 e 7 apresentam a correlação linear do DPPH nos dois tipos de extração para determinar o potencial antioxidante efetivo (E_{c50}).

Figura 6 - Correção linear do DPPH extração a quente.



Fonte - Os autores.

Figura 7 - Correção linear do DPPH extração a frio.



Fonte - Os autores.

Os valores calculados do potencial antioxidante efetivo (Ec_{50}) dos extratos brutos foram de 0,88 mg/mL para extração a quente e 0,59 mg/mL para extração a frio. De acordo com a literatura, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua Ec_{50} e maior a sua atividade antioxidante, então esses valores mostram que o extrato a frio tem poder maior de atividade antioxidante do que a extração a quente (SOUSA, 2007). Além disso, a maioria dos ativos presente em materiais de origem vegetal são sensíveis ao calor e são facilmente oxidáveis (ROBARDS, 2003), portanto, uma temperatura limite superior deve ser observado para preservar seus componentes úteis.

5 CONCLUSÕES

O uso de diferentes métodos extrativos, permitiu avaliar o efeito da temperatura, nos extratos brutos obtidos da planta *Equisetum hyemale*, analisados por espectroscopia no UV-visível e no Infravermelho, possibilitando também analisar o efeito térmico em moléculas como a clorofila e outras biomoléculas presentes na planta, como lignina, pectina e proteínas. Neste trabalho foi possível realizar a comparação de ambos os métodos extrativos, por influência térmica (Soxhlet) e influência química (Maceração), utilizando técnicas como espectroscopia no Uv-visível e na região do Infravermelho, que permitiram caracterizar o extrato bruto tanto quanto a quantificação de clorofila, quanto a quantificação de atividade antioxidante.

E o teste biológico utilizando a cultura celular em monocamadas permitiu avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos utilizados neste estudo.

A execução deste trabalho permitiu que pesquisas na área fármaco-terapêutica baseada em plantas medicinais fosse realizada com baixo custo de extração e contribuindo para a popularizando da utilização de fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v. 6, n. 42, p. 1-23, 2017.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

BARUD, H., JÚNIOR, A., SASKA, S., MESTIERI, L., et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

BASTTITI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Palmeiras das Missões, v. 11, n. 3, p. 338-348, set. 2013.

BUITRAGO, M. F.; GROEN, T. A.; HECKER, C. A.; SKIDMORE, A. K. Changes in thermal infrared spectra of plants caused by temperature and water stress. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 111, n. 1, p. 22-31, 2016.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91(Suppl. 3), p. e20190105, 2019.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FANG, Z.; BOUWKAMP, J. C.; SOLOMOS, T. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 503–510, 1998.

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 – Câmpus Dois Vizinhos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) 2011.

GUTIERREZ-GONÇALVES, M. E. J.; MARCUCCI, M. C. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante da Própolis do Estado do Ceará. **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, p. 81-86, 2009.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons. p. F4.3.1-F4.3.8. 2001.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-30, 2001.

MIYAKE, T. Métodos De Extração e Fracionamento de Extratos Vegetais. In: **XV ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - VI Encontro de Pesquisa da UEPGEAIC**. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKATA, C. H.; SANTOS, J. O.; ITABASHI, K. L.; UEDA, M. Y. L.; AVELINO, T. T. O.; SOUZA, V. R. M.; OLIVEIRA, C. J. R.; OLIVEIRA, C. R. Avaliação do extrato bruto hidroalcoólico de *equisetum arvense* (cavalinha) sobre a proliferação de fibroblastos. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 22-30, 2018.

NGUTAA, J. M.; MBARIAA, J. M.; GAKUYAB, D. W.; GATHUMBIC, P. K.; KABASAD, J. D.; KIAMAE, S. G. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, n. 1, p. 30-34, 2012.

OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; ADENIJI, A. J. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 494-504.

OLIVEIRA, R. N.; MANCINI, M. C.; OLIVEIRA, F. C. S.; PASSOS, T. M.; QUILTY, B. THIRÉ, R. M. S. M.; MCGUINNESS, G. B. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria**, v. 21, n. 3, p. 767-779, 2016.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, supl. I, p. 230-239, 2016.

PORRA, R. J. Spectrometric assays for plant, algal and bacterial chlorophylls. In GRIMM, B. et al., eds. **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry, biophysics, functions and applications**. Dordrecht: Springer Netherlands. 2006.

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. R. L. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. **Journal of Medical Food**, v. 18, n. 7, p. , 830-834, 2015.

QUEIROZ, G. M.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D.; UTRERA, S. H.; MARTINS, C. H. G.; PIETRO, R. C. R. L. Antimicrobial activity and toxicity in vitro and in vivo of *Equisetum hyemale* extracts. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 559-563, 2014.

RAJALAKSHMI, K.; BANU, N. Extraction and Estimation of Chlorophyll from Medicinal Plants. **International Journal of Science and Research**, v. 4, n. 11, p. 209-212, 2015.

RISS T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; NELSON, H.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; LI, Z.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; MINOR L.; NAPPER, A.; PELTIER, J. M.; RISS, T.; TRASK, O. J. Jr.; WEIDNER, J. Eds. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD), 2004, vol. 10.1590/S1806-83242009000300006.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 100, n. 1, p. 657-691, 2003.

SANTOS, M. A. S.; SIMÃO, A. A.; MARQUES, T. R.; SACKZ, A. A.; CORRÊA, A. D. Effect of different extraction methods on the antioxidant activity and phenolic compounds profile of cassava leaf, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2016.

SANTOS, M. O.; ALMEIDA, B. V.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACÊDO, M. J. F.; MACEDO, J. G. F.; SOUSA, F. F. S.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; ARAÚJO, T. M. S.; SOUZA, M. M. A. The conservation of native priority medicinal plants in a Caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2675-2685, 2017.

SHARAF, S., HIGAZY, A., HEBEISH, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 408-416, 2013.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR. G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SULAIMAN, I. S. C.; BASRI, M.; MASOUMI, H. R. F.; CHEE, W. J.; ASHARI, S. E.; ISMAIL, M. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 54-55, 2017.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; PONTIM, B. C. A.; CONUS, L. A influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, vol. 12, n. 4, p. 499-505, maio 2010.