

## **AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE EUISETUM ARVENSE (CAVALINHA) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS**

**Cynthia Hiromi Nakata<sup>1</sup>; Jéssica Oliveira Santos<sup>1</sup>; Kelly Lury Itabashi<sup>1</sup>; Madali Yuri Lessa Ueda<sup>1</sup>; Thais Toyomi Ohotani Avelino<sup>1</sup>; Vanessa Rodrigues de Moraes Souza<sup>1</sup>; Carlos Jorge Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Carlos Rocha Oliveira<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Graduandas do curso de Estética da Universidade Anhembi Morumbi; <sup>2</sup>Professor Doutor, em Biologia Molecular; <sup>3</sup>Professor Doutor, da Universidade Anhembi Morumbi.

---

### **Resumo**

A Equisetum arvense conhecida popularmente como cavalinha é uma planta que apresenta diversas propriedades e indicações, dentre elas: atividade diurética e adstringente do trato geniturinário, remineralizante, cicatrizante e reparadora dos tecidos ósseos e da pele. Dessa forma, considerando o crescente uso de ativos cosméticos de origem vegetal e tendo em vista a carência de pesquisas científicas sobre o mecanismo de ação destes ativos, este trabalho avaliou a ação de diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico de Equisetum arvense na proliferação de fibroblastos em diferentes períodos de tempo, além de mensurar os níveis de colágeno. Neste sentido, nossos resultados sugerem que a E. arvense na concentração de 1000ug/mL aumentou a proliferação de fibroblastos humanos, além de aumentar, embora não significativamente a quantidade de colágeno destas células. Por fim, nossos resultados nos permitem sugerir o uso da E. arvense também como auxiliar na regeneração tecidual, assim como agente capaz de melhorar a síntese de colágeno cutâneo.

**Palavras chave:** Equisetum arvense; Cavalinha; Colágeno; Fibroblasto.

---

### **Introdução**

A aparência e saúde da pele interferem diretamente na relação indivíduo, sociedade e ambiente físico. Porém, independente das mudanças nos conceitos sociais de beleza, a pele é um órgão vital (ROTTA, 2008). Além das funções sensoriais, ela atua, de forma coadjuvante, na manutenção do equilíbrio metabólico, e serve como barreira de proteção antimicrobiana, química, física, térmica e elétrica (RIBEIRO, 2013).

Conforme descrito por Baumann (2004, p. 3) “A pele é composta por três camadas principais: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo”. Segundo o autor, o conhecimento das propriedades e funções da epiderme é fundamental para a com-

preensão dos produtos e procedimentos cosméticos que podem beneficiar os pacientes, pois esta camada está relacionada em muitas das queixas de pele e seu estado pode proporcionar uma sensação de aspereza e opacidade.

No entanto, nos cosméticos e tratamentos antiaging a derme exerce um papel importante. Localizada entre a epiderme e o tecido subcutâneo, com o passar do tempo esta camada diminui em espessura e hidratação. Entre seus componentes, destacam-se no envelhecimento cutâneo: o colágeno, a elastina, as glicoproteínas e os glicoaminoglicanos (BAUMANN, 2004).

O colágeno representa de 25-30% das proteínas totais do organismo. Dentre os mais variados, o mais abundante é o tipo I, correspondente a cerca

de 80% do colágeno total do corpo e 85-90% do colágeno sintetizado na pele. (KEDE; SABATOVI-CH, 2009).

Com o avanço da idade a síntese de colágeno diminui gradativamente, as fibras elásticas tornam-se deformadas e menos flexíveis. O suporte estrutural determinado pela derme vai se perdendo, fazendo com que a pele se torne menos elástica, mais fina e menos hábil para resistir a alterações mecânicas (COUTO; NICOLAU, 2007).

As células mais comuns e responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular no tecido conjuntivo são os fibroblastos. Eles sintetizam colágeno, mucopolissacarídeo e também fibras elásticas. Além disso, elas são as que melhor crescem em culturas, cuja velocidade corresponde à das células do tecido conjuntivo.

Este fato é importante uma vez que é possível obter-se respostas biológicas *in vitro* utilizando-se células animais em cultura. Sua utilização em cultura, como sistema modelo para desenvolvimento de estudos biológicos, é decorrente da rapidez e reprodutibilidade na obtenção de respostas biológicas e da maior praticidade de trabalho (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GUIRRO; GUIRRO, 2010).

No tecido conjuntivo adulto, os fibroblastos não se dividem com frequência. Essa diminuição compromete a síntese proteica e a manutenção da matriz extracelular, gerando alterações de elasticidade e sustentação do tecido, levando a alterações no relevo cutâneo (GUIRRO; GUIRRO, 2010).

O processo de envelhecimento cutâneo se caracteriza por fatores genéticos e fatores repetitivos, como a glicação proteica, o estresse oxidativo e a deterioração da matriz extracelular. Ele é dividido em dois tipos: intrínseco ou natural, de natureza genética; e extrínseco ou foto envelhecimento, causado pelos danos dos raios UV e de outros fatores externos como poluição, fumo e álcool (BARROS; BOCK, 2009; MACIEL; OLIVEIRA, 2011).

Neste contexto, buscando formas de melhorar a aparência da pele, o mercado de cosméticos merece destaque. Este segmento está sempre se reinventando buscando novas tecnologias, pesquisando

novos princípios ativos e comprovando a eficácia na utilização dos mesmos (GILCHREST; KRUTMANN, 2007).

Entre os princípios ativos comumente utilizados nos produtos cosméticos antiaging, podemos citar: *Vitamina C (ácido ascórbico)* – antioxidante, despigmentante, tonificante, ação preventiva no foto envelhecimento e estimulante da síntese de colágeno (SCOTTI; VELASCO, 2007). Regula a produção colágena nos fibroblastos dérmicos humanos e atua como co-fator da lisil e da prolilhidroxilase, duas enzimas essenciais na síntese de colágeno (MANELA-AZULAY et al., 2003). *Alfa-hidroxiácidos* – reduzem a adesão entre os corneócitos, sendo regeneradores e renovadores. Melhoram a qualidade das fibras elásticas, aumentam a produção de colágeno e glicosaminoglicanas, devido sua ação nos fibroblastos (MARQUES; GONÇALVES, 2013). *Coenzima Q10 (Ubi-quinona)* – Previne o envelhecimento cutâneo e a oxidação dos constituintes lipídicos da pele. É comumente empregada na forma de lipossomas, favorecendo a estabilidade e liberação dessa coenzima em todas as camadas da epiderme (RIBEIRO, 2006).

Em meio à busca por inovação cosmética, a sociedade também muda sua forma de pensar, exigindo tecnologias em que a produção seja econômica, ecológica e segura, o que envolve enorme esforço na parte de pesquisas por compostos distintos, naturais e competitivos. Neste cenário, encontramos a Fito cosmética, uma parte da ciência da Cosmetologia derivada da Fitoterapia, que se dedica ao estudo e à aplicação dos princípios ativos extraídos dos vegetais (TESK; TRENTINNI, 1997; RUIVO, 2012).

Uma das plantas utilizadas na formulação de cosméticos e na medicina tradicional é a *Equisetum arvense* (cavalinha). Porém, os estudos químicos e biológicos para garantir sua segurança são escassos, pois não há um consenso sobre a dosagem efetiva e tóxica (MELO; BUDEL, 2013).

Trata-se de uma planta perene com altura entre 20 e 65 cm; caules esporíferos sobre o mesmo rizoma, simples, avermelhados, com bainhas castanhas, frouxas e apresentando uma espiga oblonga que desaparece no verão; caules estéreis, verdes,

sulcados, ocos, com ramos delgados que se inserem de dois a dois no caule, simples, verde-claros, com quatro ângulos, ásperos e articulados; rizomas profundos que atingem até 2 metros de profundidade (FERRI et al, 1981).

Segundo Wyk e Wink (2004), a *E. arvense* possui diversas aplicações farmacológicas. Dentre elas podemos citar: atividade diurética e adstringente do trato gênito urinário, remineralizante, cicatrizante e reparadora dos tecidos ósseos e da pele. Além disso, pesquisas mais recentes apontam outros efeitos, como: hipoglicemiante (REVILLA, et al., 2002); antioxidante (SILVA; CARMO, 2009), antibacteriano e antifúngico (RADULOVIC, et al., 2006).

Nos constituintes químicos da *E. arvense* encontramos sílica e ácido silícico  $\text{Si(OH)}_4$  ou  $\text{Si(OH)}_3$ , que correspondem a aproximadamente 10 a 15% dos constituintes totais da planta. Além de flavonóides, triglicérides, alcalóides, sais minerais, ácidos orgânicos, saponinas e taninos (SILVA, et al., 2009; D'AGOSTINHO, et al., 1984; FERREIRA, et al., 1999; HOLZHUTER, et al., 2003; SARTÓRIO, 2000). Segundo Ferraz et al. (2008), a *E. arvense* é a planta terrestre com maior quantidade de dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) ou sílica, a qual é depositada no caule formando uma camada superficial, sendo que o teor de silício orgânico (ligado às proteínas) varia de 0,5 a 0,8% e os teores de silício solúvel se acumulam mais nas plantas jovens. (SANTOS, et al., 2005).

Na pele, o silício desempenha um papel estrutural importante, através da ligação dos glicosaminoglicanos. Associado à vitamina C, estimula a síntese de ácido hialurônico e proteoglicanas, aumentando a afinidade da água pelas glicosaminoglicanas e reduzindo o processo de destruição da matriz dérmica produzido pelas metaloproteínas (colagenases, elastases e hialuronidasas). Com o envelhecimento, a quantidade de água na derme tende a diminuir e a presença de silício, em quantidades ideais, permite a ligação dessa água às estruturas dérmicas. Desempenha, ainda, um papel ativo na neutralização de radicais livres, prevenindo reações de glicação e atuando como mimetizador da ação de fatores de crescimento celular.

(TANAKA & MIYAZAKI, 2000)

Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a ação de diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* em diferentes períodos de tempo, na proliferação de fibroblastos humanos e o aumento da síntese colágena.

Tendo em vista a busca por novos ativos cosméticos de origem natural para tratar e prevenir o envelhecimento cutâneo, este estudo visa avaliar a atividade proliferativa em fibroblastos e sua síntese de colágeno, após exposição em diferentes tempos e em diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico de *Equisetum arvense* (cavalinha), o qual apresenta um teor de 10-15% de silício, um mineral de importante função na estrutura da dérmica.

## Material e método

### Delineamento experimental

Esse Trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembí. A linhagem de fibroblastos CCD - 1072 Sk, que corresponde a fibroblastos humanos de recém-nascido do sexo masculino, fornecida pela organização ATCC (<http://www.atcc.org>), será submetida ao tratamento com diferentes concentrações de extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense*, gentilmente cedido pela Farmácia e Laboratório Homeopático Almeida Prado, localizado na Rua Xavier de Toledo, no centro de São Paulo. Após os tratamentos serão realizadas avaliações da viabilidade celular do composto testado frente à linhagem CCD - 1072Sk.

### Cultura celular

As células da linhagem CCD - 1072Sk serão cultivadas em meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino, 0,292 g/l de L-glutamina, 1,0 g/l de D-glicose, 2,2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/l de Estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> ( $1 \times 10^5$  cells/mL) em estufa úmida com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a

37 °C. Em todos os experimentos as culturas de fibroblastos foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e foi realizada a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular for igual ou superior a 95%.

#### **Avaliação da citotoxicidade (determinação IC50)**

A citotoxicidade do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* foi realizada pelo método de incorporação do corante azul de tripan, onde após 24, 48 e 72 horas de incubação com concentrações de 1 a 5 mg/mL do extrato e controles positivos utilizando ácido ascórbico, o conteúdo de cada poço das culturas de fibroblastos foram recolhidos em tubos de 15 mL, e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de meio ISCOVE'S. Após isso, as soluções de células foram diluídas (1:2) em corante de azul de tripan e a contagem das células viáveis e inviáveis foi realizada em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. A soma da contagem de células totais (viáveis e inviáveis de cada poço) foi considerada como 100% de células, sendo realizados os cálculos para verificar as porcentagens correspondentes às células viáveis e as inviáveis analisadas no experimento.

#### **Ensaio de redução MTT à formazan**

O teste de redução MTT ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]) é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um screening inicial de fármacos.

Sua interpretação serve de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox inclui tanto mitocôndria como o citosol. A redução do sal de MTT à formazan é realizada principalmente pela enzima succinato-desidrogenase, e resulta em cristais de formazan insolúveis na cor violeta. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mi-

tocondrial e consequentemente a viabilidade celular (MOSMANN et al., 1983). Assim, às células tratadas com diferentes concentrações de extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* e na concentração  $5 \times 10^4$  células por poço, foram adicionados 10 µl da solução de MTT 5mg/mL (Sigma-Aldrich) em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada, o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa dissolvido com 100 µL de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas (FlexStation® 3 multimode benchtop reader) em 540 nm. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço (com droga)} \times 100}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}}$$

#### **Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (PI)**

Foram realizados ensaios de incorporação do iodeto de propídeo (PI) para avaliação de morte celular por citometria de fluxo (Riccardi & Nicoletti, 2006). Resumidamente, as células foram plasmadas em placas de vinte e quatro poços (densidade inicial em células/poço, de  $2 \times 10^5$ ) e a elas foi adicionada a solução fluorocrômica hipotônica (HFS – 0,1% p/v de citrato de sódio trissódico, 0,5% p/v de Triton-X 100 e 50 µg/mL de iodeto de propídeo). Após período de incubação de quatro horas, a 4 °C e ao abrigo da luz, as células e o sobrenadante foram recolhidos e analisados. Foi utilizado o citômetro de fluxo FACScan, o programa CELLQuest e os dados obtidos, considerando-se 20.000 eventos por análise em cada ensaio, foram analisados no programa WinMDI 2.8.

#### **Sirius Red - quantificação de colágeno**

As células serão cultivadas e tratadas conforme descrito anteriormente. Após cultivo, o meio foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS 0,1M. Foram adicionados 100 µl de Fluido de

Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1 h. As amostras foram lavadas com PBS, em seguida, adicionado o corante Sirius Red. Após o tempo de 1 h, será removido o máximo do corante e procedendo-se à lavagem com 150 µl de solução de ácido hidrocloreto 0,01M por 30 seg para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1M durante 30 min. Aliquotas de 100 µl das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA) a 570 nm.

### Hipótese

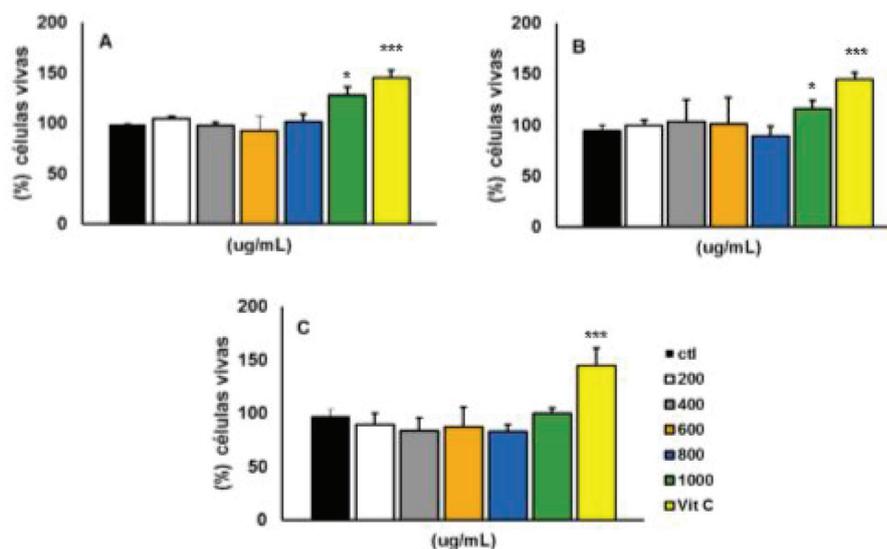
Considerando que o silício é um nutriente de grande importância na produção de colágeno e é encontrado em quantidade considerável no *Equisetum arvense* (cavalinha), este estudo busca estimular a atividade proliferativa e a síntese de

fibras colágenas em fibroblastos humanos (CCD - 1072Sk), a partir de estímulos com o extrato bruto hidroalcoólico de *Equisetum arvense*, seguindo duas variáveis, tempo e concentração. Dessa forma, encontraremos a dose e o tempo de melhor produção colágena fornecida pela planta

### Resultados

De acordo com a técnica de azul de tripan, os resultados obtidos sugerem que o extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* exerce atividade proliferativa na concentração de 1000 µg/mL. Neste sentido, a figura 1 mostra as diferentes concentrações do extrato e os diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Conforme a figura 1, podemos observar que no tempo 24 horas obtivemos o melhor resultado em relação à viabilidade celular quando comparado ao controle.

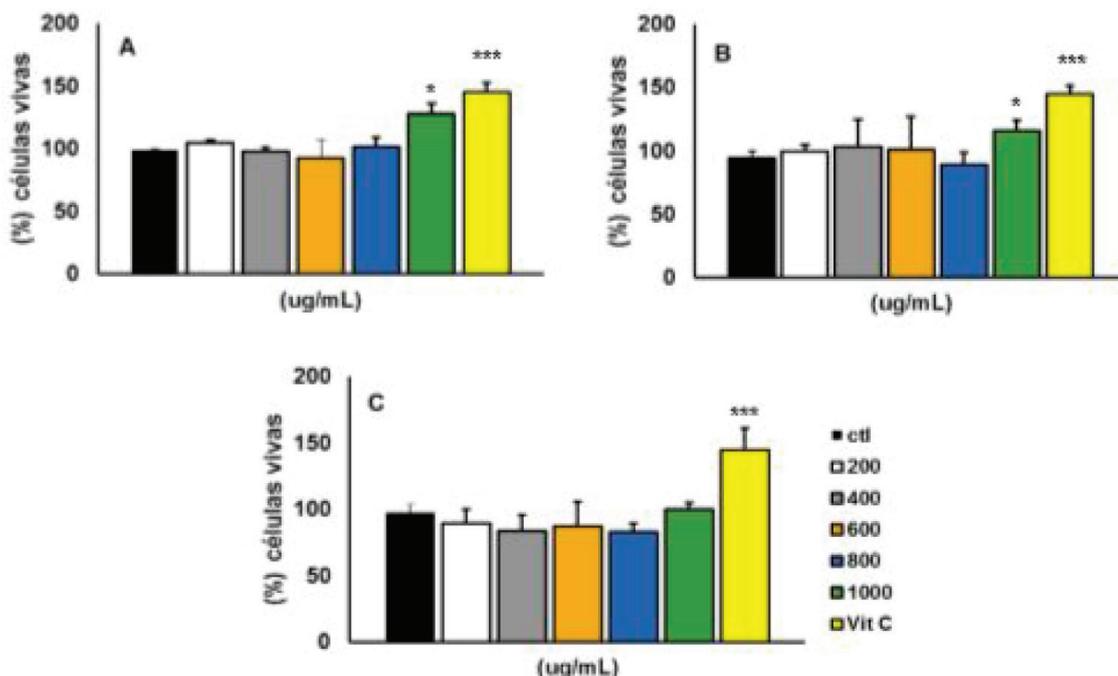
Já nos outros tempos, não observamos proliferação significativamente aumentada, embora a tendência seja observada.



**Figura 1:** Efeitos da exposição do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. (A) Exposição por 24 horas, após período de carenciamento. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). (B) Exposição por 48 horas, após período de carenciamento. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). (C) Exposição por 72 horas, após período de carenciamento. \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). Ensaios realizados em triplicata. GraphPad Prism V.5.0.

No mesmo sentido, a técnica de redução do MTT foi realizada com o objetivo de confirmar a atividade proliferativa da *E. arvensis*. A figura 2 mostra os resultados obtidos nos diferentes tempos de exposição e das diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvensis*. De

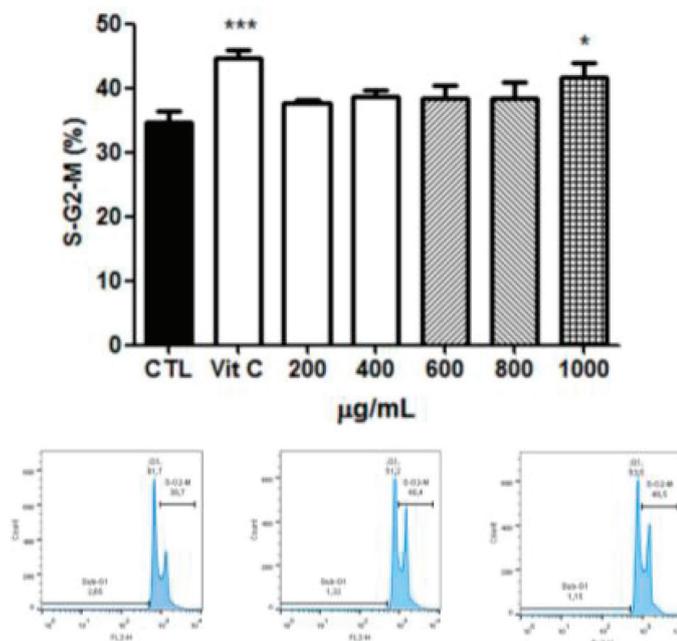
modo semelhante ao teste com azul de tripan, o teste de MTT indicou a concentração de 1000 µg/mL como sendo aquela que mais aumentou a viabilidade celular. No entanto, por esta técnica, a exposição por 48 horas indicou um aumento na maior concentração do extrato estudado.



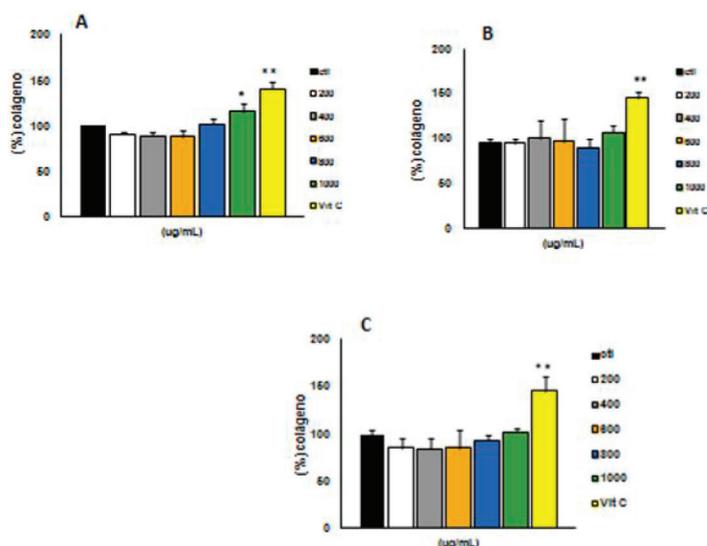
**Figura 2:** Efeitos da exposição do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvensis* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. (A) Exposição por 24 horas, após período de carenciamento. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). (B) Exposição por 48 horas, após período de carenciamento. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). (C) Exposição por 72 horas, após período de carenciamento. \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). Ensaios realizados em triplicata. GraphPad Prism V.5.0.

Em relação à análise do ciclo celular e o percentual de células da população S-G2M, os resultados representados na figura 3 mostraram aumento significativo destas células, quando submetidas ao tratamento por 24 horas com a concentração de 1000 µg/mL do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvensis* quando comparado ao controle. Contudo, ao compararmos o percentual da *E. arvensis* com a vitamina C isolada, esta se mostrou mais efetiva.

A quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos CCD-1072SK foi realizado pela técnica que emprega o corante ácido Sirius Red. Os resultados mostraram que o teor de colágeno na concentração testada de 1000 µg/mL aumentou, embora não com significância estatística (figura 4).



**Figura 3:** Percentual de células em fase S-G2M do ciclo celular após exposição do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. (A) Exposição por 24 horas, após período de carenciamento. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). (B) Histogramas representativos da análise realizada por citometria de fluxo através da incorporação de iodeto propídeo. Ensaios realizados em triplicata. GraphPad Prism V.5.0.



**Figura 4:** Teor de colágeno total em fibroblastos através da incorporação do corante Sirius Red após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de exposição à concentração de diferentes concentrações de *E. arvense*. Antes do início dos testes, as células foram carenciadas de soro fetal bovino. A exposição não causou aumento significativo em relação ao grupo controle (células não tratadas). \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle. (ANOVA, Tukey). \*\*\* $P < 0,05$ , controle positivo - vitamina C (ANOVA, Tukey). Ensaios realizados em triplicata. GraphPad Prism V.5.0.

## Discussão

Estudos envolvendo a capacidade proliferativa de extratos vegetais são cada vez mais encontrados na literatura científica (SALEH, F., et al, 2014). Embora alguns procurem verificar a atividade citotóxica e/ou antiproliferativa do extrato de *E. arvense* (TEPKEEVA, et al, 2009; CETOJEVIC-SIMIN, et al, 2010) nosso trabalho procurou investigar a capacidade proliferativa da planta em diferentes tempos de exposição e sob diferentes concentrações. De acordo com os resultados obtidos, a concentração de 1000 µg/mL do extrato bruto hidroalcoólico de *E. arvense* foi capaz de aumentar de modo significativo o percentual de fibroblastos se comparado ao controle não tratado. A concentração que se mostrou mais ativa encontra-se superior à faixa de raros trabalhos que procuraram verificar esta ação proliferativa da *E. arvense*, como por exemplo, o estudo conduzido por Bessa, et al (2012), que utilizou concentrações entre 100 e 500 µg/mL na proliferação de osteoblastos.

Outro dado interessante foi o tempo de exposição, uma vez que tempos maiores do que 24 horas não se mostraram tão eficientes na proliferação das células estudadas, sugerindo que o maior percentual de proliferação acontece nas primeiras 24 horas.

A quantidade de colágeno dosada nos fibroblastos testados indica que a *E. arvense*, além de aumentar o número de células, pode também incrementar a quantidade de colágenos nestas culturas.

Por fim, a escolha deste vegetal para utilização neste trabalho se deveu pelo fato de trabalhos mostrarem que a *E. arvense* é a planta terrestre com maior quantidade de sílica (FERRAZ et. al., 2008), apresentando em sua composição química um teor de sílica e ácido silícico de aproximadamente 15% e 0,5 à 0,8% de silício orgânico (SANTOS, et al., 2005). Deste modo, nossos resultados abrem uma perspectiva para a utilização da *E. arvense* não apenas como um ativo cosmético relacionado à atividade diurética e adstringente (WYK; WYNK, 2004), mas também como um auxiliar na proliferação celular e aumento na síntese de colágeno.

## Referências bibliográficas

- ALONSO, J.R.; Tratado de Fito Medicina – Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.
- AMOROZO, M. C. M. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: di Stasi, L. C. (org.). Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia para o estudo Interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996. p. 4768.
- BALMÉ, F.; Plantas Mediciniais. Ed. Helmus, 1994.
- BARROS, C.M; BOCK, P.M. Vitamina C na prevenção do envelhecimento cutâneo. 2009. Disponível
- BAUMANN, Leslie. Conceitos Básicos da Ciência da Pele. In: \_\_\_\_\_ Dermatologia Cosmética – Princípios e prática. Rio de Janeiro, RJ: Revinter, 2004. p. 3-12.
- BESSA PEREIRA C, GOMES PS, COSTA-RODRIGUES J, ALMEIDA PALMAS R, VIEIRA L, FERREAZ MP, LOPES MA, FERNANDES MH. Equisetum arvense hydromethanolic extracts in bone tissue regeneration: in vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity. Cell Prolif. 2012 Aug;45(4):386-96.
- CETOJEVIC-SIMIN DD, CANADANOVIĆ-BRUNET JM, BOGDANOVIĆ GM, DJILAS SM, CETKOVIĆ GS, TUMBAS VT, STOJILJKOVIĆ BT. Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. Department of Experimental Oncology, Oncology Institute of Vojvodina, Sremska Kamenica, Serbia. J Med Food. 2010 Apr;13(2):452-9.
- COUTO, J.P.A; NICOLAU, R.A. Estudo do envelhecimento da derme e epiderme. – revisão bibliográfica. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, São Paulo, 2007.
- D'AGOSTINHO, M.; DINI, A.; PIZZA, C.; SENATORE, F.; AQUINO, R.. Sterols from *Equisetum arvense*. Boll Soc Ital Biol Sper, 30; 60 (12). 1984. p.2241-5. Pubmed; PMID: 6529502
- FERRAZ M, PEREIRA A, LOPES M, FERNANDES M. *Equisetum Arvense*: Avaliação das Possibilidades de aplicação na regeneração Óssea. Universidade Fernando Pessoa. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, 5. Porto, 2008. p. 138. ISSN 1646-0480.
- FERREIRA, I., et al. 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.ilus.
- FERRI, M. G.; MENEZES, N. L. de; MONTEIRO-S-CANAVACCA, W. R. Glossário Ilustrado de Botânica. 1 ed. São Paulo, SP: NOBEL, 1981, 197p.
- GILCHREST, B.A; KRUTMANN, J. Envelhecimento cutâneo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- HOLZHUTER, G., et al. Structure of sílica in *Equisetum arvense*. Anuario Department of physics, Universit Rostock, Germany. Bioanal Chem, 2003. p. 512517.DOI: 10.1007/s00216-003-1905-2.
- KEDE, Maria P.V.; SABATOVICH, O. Dermatologia estética. 2ª ed. rev., ampl. São Paulo: Atheneu, 2009.
- MACIEL, D; OLIVEIRA, G.G. Prevenção do envelhecimento cutâneo e atenuação de linhas de expressão pelo aumento da síntese de colágeno. V congresso multiprofissional em saúde – atenção ao idoso. Uni-Fil. Londrina, Paraná, 2011.
- MANELA-AZULAY, Mônica et al. Vitamina C. An. Bras. Dermatol. Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, June 2003. Acesso em 24 jun. 2014.
- MARQUES, M. A.; GONÇALVES, S.M.F. Como utilizar produtos cosméticos. In: PEREIRA, Maria de Fátima (org.). Recursos Técnicos em Estética. Vol II, São Caetano do Sul, SP: Difusão Editora, 2013, cap. 9.
- MELO, M.; BUDEL, J.M. EQUISETUM L.(EQUISETACEAE): Uma Revisão. Cadernos das Escolas de Saúde, v. 1, n. 9, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. V. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. p.64-65, 2000.
- RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; PALIĆ, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Phytotherapy Research, v.20, 2006, p. 85–88.
- REVILLA, M.C.; ANDRADE-CETTO A., ISLAS S.; WIEDENENFELD H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. Journal of Ethnopharmacology 81, México, 2002. p. 81 – 120. RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada à dermoestética. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- RIBEIRO, Denise. Queimaduras. In: PEREIRA, Maria de Fátima (org.). Recursos Técnicos em Estética. Vol II, São Caetano do Sul, SP: Difusão Editora, 2013, cap. 1.
- ROTTA, Osmar. A Pele Normal. In: \_\_\_\_\_ Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP -EPM: dermatologia clínica, cirúrgica e cosmiatria. Barueri, SP: Manole, 2008. cap. 1.
- RUIVO, Joana Sofia Pais. Fito cosmética: aplicação de extratos vegetais em cosmética e Dermatologia, Acesso em: 14 de março 2014.
- SALEH, Farid et al. “Analysis of the Effect of the Active Compound of Green Tea (EGCG) on the Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells.” BMC Complementary and Alternative Medicine 14.1 (2014): 322. PMC. Web. 20 nov. 2014.
- SANTOS, J.G. et al. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense* L. Department of Psychobiology, Neurophysiology Laboratory, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. abr. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: jun. 2014.
- SANTOS, Mateus Casanova dos; BRUSCATTO, Mariângela Hoffmann; HECK, Rita Maria. Reflexões fitoterápicas sobre a cavalinha (*Equisetum* SP. L) com base na antroposofia – Um diálogo possível. Disponível em: <[http://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CS/CS\\_00626.pdf](http://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CS/CS_00626.pdf)> Acesso em: 17 de março de 2014.
- SCOTTI, L; VELASCO, M.V.R. Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia; estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo: Tecnopress, 2003.
- SILVA, W.; CARMO, D.R., 2009. Comportamento Volumétrico do Ácido Ascórbico em presença da erva *Equisetum arvense*. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, curso de agronomia, UNESP, São Paulo, 2009. p. 4486 - 4489.
- TANAKA & MIYAZAKI, Application of silicium for cosmetics. Frag J, v.11, n.28.,
- TEPKEEVA II, AUSHEV VN, ZBOROVSKAYA IB, DEMUSHKIN VP. Cytostatic activity of peptide extracts of medicinal plants on transformed A549, H1299, and HeLa Cells. Bull Exp Biol Med. 2009 Jan; 147(1):48-51.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M. Herbarium compêdio de fitoterapia. 3 ed. Curitiba, 1997. 317p.
- TOLEDO, Anna Maria Farias. Pele e Anexos. In: MAIO, Maurício (editor). Tratado de Medicina Estética. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2004, cap. 2
- WAGNER, Hildeber; WISENAUER, Markus. Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- WYK, Ben-Erik V.; WINK, Michael. Medicinal plants of the world. 1.ed. Portland: Timber Press, 2004. 480p.