

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

**FERNANDA FARIAS DUQUE**

*Magister Scientiae*

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Achillea millefolium* SOBRE  
*Colletotrichum gloeosporioides***

São Mateus, ES  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Achillea millefolium* SOBRE  
*Colletotrichum gloeosporioides***

**FERNANDA FARIAS DUQUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva

**São Mateus, ES  
Fevereiro de 2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D946d Duque, Fernanda Farias, 1986-  
Determinação do perfil cromatográfico e avaliação da  
atividade do extrato etanólico de *Achillea millefolium* sobre  
*Colletotrichum gloeosporioides* / Fernanda Farias Duque. – 2013.  
58 f. : il.

Orientador: Marcelo Barreto da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário  
Norte do Espírito Santo.

1. Antracnose. 2. *Colletotrichum gloeosporioides*. 3. Análise  
cromatográfica. 4. Fungicidas. I. Silva, Marcelo Barreto da. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário  
Norte do Espírito Santo. III. Título.

CDU: 63

---

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Achillea millefolium* SOBRE  
*Colletotrichum gloeosporioides***

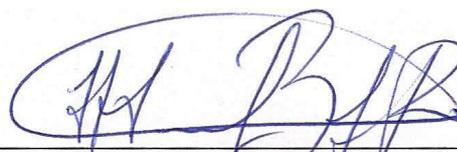
**FERNANDA FARIAS DUQUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

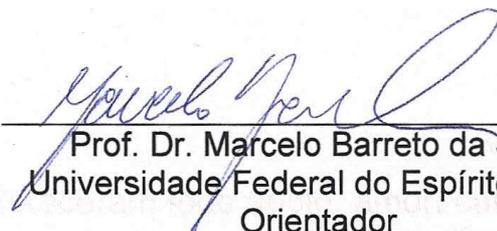
Aprovada: 27 de fevereiro de 2013.



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Masrouah Jamal  
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Marcelo Barcellos de Rosa  
Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

Aos meus pais Fernando e Mirtis,  
que me ofereceram todo apoio, amor, carinho, compreensão e incentivos  
necessários para a realização e conquista de uma etapa tão sonhada em  
minha vida,  
dedico.

*“Eu não luto porque acho que vou vencer;  
eu sei que vou vencer, é por isso que eu luto!”*

Kurosaki Ichigo

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Valdenir José Belinelo (*in memoriam*) pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação, por ter guiado meus primeiros passos na pesquisa. Nem a morte apagará os ensinamentos de um mestre.

Principalmente a Deus por guiar meus passos, me dar forças pra continuar mesmo com tantas dificuldades, tornando meu sonho possível.

Em especial ao professor Dr. Marcelo Barreto da Silva por aceitar me orientar em período já avançado do mestrado, pela paciência interminável, incentivo constante, amizade, confiança e ensinamentos.

Aos meus pais Fernando e Mirtis pelo amor incondicional, dedicação, incentivo, tolerância com minhas ansiedades, frustrações e inseguranças, sendo um porto seguro no qual recarreguei diversas vezes a bateria e por apoiar todas as minhas decisões.

À minha irmã Lila pela amizade, apoio e companheirismo e ao meu sobrinho Daniel pelo amor e alegria sempre.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical pelos ensinamentos e pela colaboração para a superação de alguns obstáculos de diferentes naturezas.

À professora Dra. Cláudia M. Jamal pelas correções e sugestões neste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Barcellos da Rosa pela ajuda nas análises químicas, correções e sugestões neste trabalho.

Aos colegas do mestrado, pelos momentos divididos juntos.

Ao Biágio, sua esposa Elisandra e sua filhinha Elis, que se tornaram verdadeiros amigos e me acolheram como parte da sua família.

Aos meus irmãos de coração Carmelita e Tony pela amizade, conselhos e carinho ao longo dessa jornada.

Aos bolsistas de iniciação científica e técnicos de laboratório pelo auxílio na execução do experimento.

Aos meus amigos de longe pela compreensão, força e otimismo nos momentos de desesperança, desânimo e cansaço, que sempre entenderam a minha ausência durante o curso. Ao Alisson Vitorino pela análise de dados e amizade.

Aos novos e eternos amigos Kristhiano Chagas, Francisco, Rodrigo, Graziela, Alessandra, Clemilton, Huston, Raul, pela companhia em São Mateus.

A todos que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

## **BIOGRAFIA**

Fernanda Farias Duque, filha de Fernando Farias Dias e Mirtis Vieira e Duques, nasceu em 31 de julho de 1986, na cidade de Teófilo Otoni, MG.

Em dezembro de 2006, graduou-se em Química-Licenciatura Plena pela Universidade Vale do Rio Doce, em Governador Valadares.

Em setembro de 2008 concluiu o curso de Pós-Graduação Lato-sensu em Química pela Universidade Federal de Lavras.

Em março de 2011, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical em nível de Mestrado, na Universidade Federal do Espírito Santo, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2013.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Compostos químicos presentes na família Asteraceae.....	4
FIGURA 2. <i>A. millefolium</i> fotografada na área de cultivo orgânico da Escola Nova Esperança, em São Mateus, ES. Flores de <i>A. millefolium</i> .....	5
FIGURA 3. Principais rotas biossintéticas dos flavonóides.....	13
FIGURA 4. Placa cromatográfica de sílica-gel após o fracionamento do extrato etanólico de <i>A. millefolium</i> .....	20
FIGURA 5. Cromatograma em 254 nm da fração F1 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	21
FIGURA 6. Cromatograma em 320nm da fração F2 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	21
FIGURA 7. Cromatograma em 320nm da fração F3 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	22
FIGURA 8. Cromatograma em 320nm da fração F4 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	22
FIGURA 9. Cromatograma em 320nm da fração F5 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	23
FIGURA 10. Crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> sob influência de diferentes concentrações da fração F3 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	26
FIGURA 11. Crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> sob influência de diferentes concentrações da fração F4 do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> coletada em outubro de 2010.....	27
FIGURA 12. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função dos meses de coleta.....	28
FIGURA 13. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função das partes da planta.....	29
FIGURA 14. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função das frações (F1, F2, F3, F4 e F5).....	30
FIGURA 15. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função dos meses de coleta e partes da planta.....	30
FIGURA 16. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função das frações dos extratos e meses de coleta.....	31

FIGURA 17. Variação do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> em função das frações dos extratos e partes da planta.....	31
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Peso das frações de flor, folha e ramo de <i>A. millefolium</i> coletadas em setembro e outubro de 2010, obtidas por CCD.....	17
TABELA 2. Descrição das frações dos extratos.....	18
TABELA 3. Relação dos compostos identificados nas frações do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> , o tempo de retenção, a área do padrão utilizado na identificação e da amostra e suas respectivas concentrações.....	24
TABELA 4. Atividade farmacológica dos fitocompostos detectados nas frações etanólicas de <i>A. millefolium</i> .....	25
TABELA 5. Equações de regressão, valores de ED <sub>50</sub> (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> a frações do extrato etanólico de <i>A. millefolium</i> .....	26

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	03
2.1 Objetivo Geral.....	03
2.2 Objetivos Específicos.....	03
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Preparação do material vegetal e dos extratos etanólicos.....	16
4.2 Preparação das placas cromatográficas, aplicação da amostra e obtenção das frações.....	16
4.3 Identificação e quantificação dos fitocompostos via HPLC.....	17
4.4 Identificação e quantificação dos fitocompostos via GC-MS.....	18
4.5 Avaliação da atividade de frações do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> em diferentes concentrações sobre <i>C. gloeosporioides</i> .....	18
4.6 Avaliação da atividade de frações do extrato etanólico das partes de <i>A. millefolium</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i> .....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
5.1 Separação das frações.....	20
5.2 Identificação e quantificação dos fitocompostos.....	20
5.3 Ensaios com frações do extrato etanólico da folha de <i>A. millefolium</i> em diferentes concentrações.....	25
5.4 Atividade dos extratos etanólicos de <i>A. millefolium</i> em função da parte da planta e do mês de coleta.....	28
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>ANEXO 1</b> .....	43
Anexo 1. Características experimentais do método cromatográfico empregado neste trabalho.....	44

## RESUMO

DUQUE, Fernanda Farias; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2013; **DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Achillea millefolium* SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides***; Orientador: Marcelo Barreto da Silva

A *Achillea millefolium*, conhecida como mil-folhas ou aquiléia, é uma planta da família *Asteraceae* e possui atividade como antibacteriana, antifúngica, antitumoral, cicatrizante, antioxidante e antiedematosa. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil cromatográfico e avaliar a atividade fungicida *in vitro* do extrato etanólico de *A. millefolium* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose em frutos de mamão. Partes da planta foram coletadas em dois meses diferentes e separadas em flores, folhas e ramos. Os bioensaios foram realizados com os extratos etanólicos secos, obtido por técnica de maceração e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Estes extratos foram submetidos a cromatografia preparativa em camada delgada (CCD) sendo obtidas cinco frações. Estas frações foram diluídas, separadamente, em 150µL de DMSO e incorporada em BDA. Após solidificação do meio, um disco de 0,6cm de diâmetro com o fungo foi colocado no centro da placa de petri e incubado a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após crescimento avaliou-se o crescimento radial do micélio. O delineamento experimental utilizado foi análise fatorial e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A atividade antifúngica foi evidenciada contra *C. gloeosporioides* sendo que as frações F4 e F5 de folha e flor coletadas em outubro tiveram a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial. O perfil cromatográfico das frações do extrato foi realizado através de análises utilizando HPLC-DAD e GC-MS. Através das análises utilizando HPLC e GC da folha coletada em outubro foi possível detectar a presença de ácido cumárico, ácido ferúlico e rutina nas frações F4 e F5.

**Palavras-chave:** mil-folhas, antracnose, bioensaios.

## ABSTRACT

DUQUE, Fernanda Farias, M.Sc., Federal University of Espírito Santo; February 2013; **DETERMINATION OF CROMATOGRAPHIC PROFLE AND EVALUATION OF THE ACTIVITY OF EXTRACT ETHANOLIC *Achillea millefolium* ON *Colletotrichum gloeosporioides***; Advisor: Marcelo Barreto da Silva

The *Achillea millefolium*, known as *mil-folhas* or *aquilea*, is a plant of the Asteraceae family and possesses activity as antibacterial, antifungal, antitumor, healing, antioxidant and antiedematosa. The aim of this study was to determine the elution profile and evaluate the *in vitro* antifungal activity of the ethanol extract of *A. millefolium* on *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on papaya fruits. Parts of the plant were collected in two different months and separated into flowers, leaves and branches. Bioassays were performed with dry ethanolic extracts obtained by maceration technique and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure. These extracts were subjected to preparative thin layer chromatography (TLC) was obtained five fractions. These fractions were diluted separately in 150 $\mu$ L of DMSO and incorporated in BDA. After solidification of the medium, a disc of 0.6 cm diameter with the fungus was placed in the center of a petri dish and incubated at  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . After growth evaluated the radial growth of the mycelium. The experimental design was factorial analysis and the means were compared by Tukey test at 5% probability. The antifungal activity was observed against *C. gloeosporioides* whereas fractions F4 and F5 of leaf and flower collected in october had the highest percentage of mycelial growth inhibition. The chromatographic profile of the fractions of the extract was performed by analysis using HPLC-DAD and GC-MS. Through analysis using HPLC and GC leaf collected in october was possible to detect the presence of coumaric acid, ferulic acid and rutin in fractions F4 and F5.

Keywords: yarrow, anthracnose, bioassays.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil, em 2002, contribuiu com 25% da produção mundial de mamão, sendo considerado um dos maiores produtores e exportadores mundiais (FNP 2005). Um dos fatores limitantes à exportação do mamão é a antracnose, doença pós-colheita causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, e causa perdas de até 90% dos frutos (TATAGIBA *et al.*, 2002). A doença é caracterizada por lesões arredondadas, grandes, necróticas, podendo ocorrer uma podridão mole nos frutos (BAILEY *et al.*, 1992; LIMA FILHO *et al.*, 2003). Nas regiões Norte do Espírito Santo e Sul da Bahia, a elevada incidência da antracnose, nos meses mais quentes e úmidos do ano (outubro a março), tem limitado a comercialização dos frutos, tanto para o mercado interno, quanto para exportação (MARIN, 2004), sendo que esta época coincide com a maior produção de frutos. Uma das formas de controle da doença é feita aplicando fungicidas durante a formação do fruto (LIBERATO & ZAMBOLIN, 2002). Porém, o uso indiscriminado de tais produtos pode prejudicar a saúde dos agricultores e consumidores, contaminar o meio ambiente, e causar resistência de fitopatógenos (GHINI & KIMATI, 2000; SOARES, 2010).

A busca de alternativas que diminuam os impactos no ambiente e ao ser humano tem sido desenvolvidas, utilizando produtos naturais como óleos essenciais e extratos de plantas medicinais, que apresentam substâncias com atividade fungicida em sua composição (FAWCETT & SPENCER, 1970; GARCIA *et al.*, 2012). Muitos estudos tem mostrado que compostos isolados de plantas são eficazes atuando na inibição da atividade antifúngica e podem ser uma alternativa de controle na substituição de produtos químicos (PEREIRA, 2006).

As plantas medicinais possuem compostos secundários, responsáveis por fornecer proteção às plantas, exercem atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral (STANGARLIN *et al.*, 1999). O metabolismo secundário das plantas sintetiza compostos que pertencem a várias classes de substâncias químicas, como terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos, cumarinas, flavonóides, entre outras (DI STASI, 1996; DINIZ *et al.*, 2006; GACHOMO & KOTCHONI, 2008).

Dentre estas plantas medicinais encontra-se a *Achillea millefolium*, também conhecida como aquileia ou mil-folhas e pertence a família Asteraceae. Em estudos realizados por Silva *et al.*, 2008, verificaram que os extratos brutos de *Achillea* foram capazes de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos do gênero

*Colletotrichum*. O óleo essencial da *A. millefolium* é rico em azuleno, camazuleno, pineno, cineol, cânfora,  $\alpha$ -bisabolol, monoterpenos, eucaliptol, borneol, derivados terpênicos, sesquiterpênicos, taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, esteróides, ácidos graxos, alcalóides, lactonas e flavonóides (LORENZI & MATOS, 2002; CANDAN *et al.*, 2003). Devido a diversidade de constituintes químicos tem sido utilizada como antitumoral, cicatrizante, antioxidante, antiedematosa, antibacteriana, antifúngica (ISAAC *et al.*, 1999; SWEETMAN, 2002; LI *et al.*, 1993 apud FUMAGALI, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica e a composição química de frações do extrato etanólico de flores, folhas e ramos de *Achillea millefolium* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção do extrato etanólico de flores, folhas e ramos de *Achillea millefolium*.
- Fracionamento dos extratos etanólicos obtidos.
- Determinar a possível atividade antifúngica de frações dos extratos etanólicos das partes (flor, folha e ramo) de *A. millefolium* coletadas em meses distintos.
- Caracterizar quimicamente, através de HPLC e GC as frações do extrato etanólico de uma das partes (flor, folha e ramo) de *A. millefolium* que apresentarem efeito fungicida.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A família *asteraceae* ou *compositae* é uma das maiores nas angiospermas, possuindo cerca de 1.500 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, arranjadas em 4 sub-famílias e 17 tribos (BREMER, 1994). Como representantes importantes da família podem-se citar o girassol, *Helianthus annuus*, de grande importância agrícola e econômica; a camomila, *Matricaria chamomilla*, empregada como anti-espasmódico; a arnica, *Arnica montana*, como anti-inflamatória (ZARDINI, 1991), a mil-folhas, *Achillea millefolium*, usada com várias propriedades medicinais (SWEETMAN *et al.*, 2002), entre outras, todas com diversas atividades biológicas.

A química de *asteraceae* tem sido empregada na investigação de aspectos taxonômicos (SPRING & BUSHMANN, 1994). Até 1990, aproximadamente 7.000 constituintes haviam sido isolados de apenas 5.000 espécies da família (BOHLMANN, 1990; BOHLMANN & ZDERO, 1990).

Na família *asteraceae* há a ocorrência de diferentes tipos de terpenóides, poliacetilenos, flavonóides, cumarinas, benzofuranos, derivados de p-hidroxiacetofenonas e de fenilpropanóides (Figura 1). (ALVARENGA *et al.*, 2001; BOHLMANN & ZDERO, 1990; HEYWOOD *et al.*, 1977).

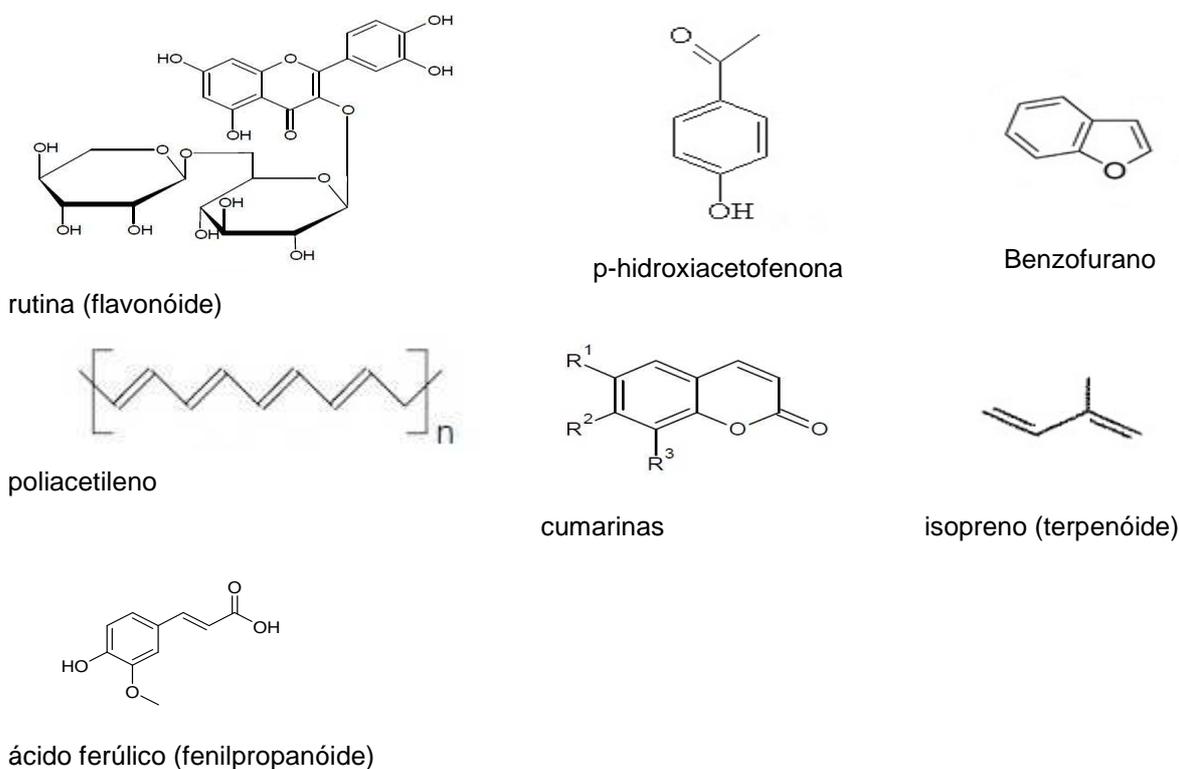


FIGURA 1. Compostos químicos presentes na família Asteraceae.

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. (Figura 2), é conhecida popularmente como mil-folhas, milefólio, milenrama, aquiléia, botão-de-prata, erva-de-carpinteiro e cento em ramos (LORENZI & MATOS, 2002; OFICINA DE ERVAS, 2006; MARTINS *et al.*, 2000). O gênero *Achillea*, provavelmente recebeu este nome devido ao herói da mitologia grega, Aquiles, utilizar as folhas da *A. millefolium* durante a guerra de Tróia (~1200 a.C.) para estancar a hemorragia dos soldados feridos (CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998). A espécie *millefolium* provavelmente foi denominada dessa forma devido ao aspecto da folha semelhante a inúmeras folhas em uma (CHANDLER, 1989). Pertence à família Asteraceae, de origem Européia, erva perene, vivaz, rizomatosa, possui altura aproximada de 30-50 cm, caule reto e folhoso, folhas compostas, compridas, tenras e com segmentos delicadamente divididos, flores dimorfas de coloração branca, reunidas em capítulos densamente corimbosos (Figura 2) (CHANDLER *et al.*, 1982).



FIGURA 2. *A. millefolium* fotografada na área de cultivo orgânico da Escola Nova Esperança, em São Mateus, ES. Flores de *A. millefolium* (Fonte: acervo pessoal).

Devido suas numerosas propriedades medicinais, a *A. millefolium* tem sido muito utilizada na medicina popular como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, citotóxica, antioxidante, antitumoral, propriedades analgésicas e antipiréticas (BENEDEK *et al.*, 2007; CHANDLER *et al.*, 1982, CORREA Jr *et al.*, 1994).

Tem sido relatados estudos com diferentes tipos de extratos de *A. millefolium* com atividade antifúngica elevada, tanto para fungos humanos e fitopatogênicos. Em 2003, Kuhajek e colaboradores observaram o efeito do extrato das raízes contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Colletotrichum*

*acutatum*, *Colletotrichum fragariae* [Glomerella cingulata], *Colletotrichum gloeosporioides* [G. cingulata], *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora nicotianae*.

Análises químicas de óleo essencial mostraram a presença de terpenos (cineol, borneol, pinenos, cânfora, azuleno), derivados terpênicos e sesquiterpênicos, taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, esteróides, ácidos graxos, alcalóides e princípio amargo (MARTINS *et al.*, 2000). Em estudos realizados por Souza *et al.* (2006) compostos do tipo lactonas e flavonóides, epigenol e luteolol e seus glicosídeos, artemetina e rutina foram detectados nas flores e folhas de *A. millefolium*.

A prospecção fitoquímica da *A. millefolium* realizada por Peres *et al.* (2008) mostrou a presença de metabólitos secundários, os quais apresentam potencialmente propriedades antimicrobianas. No mesmo trabalho foi realizado testes de atividade antifúngica da planta, inibindo 55% no crescimento micelial de *Colletotrichum musae*, indicando a potencialidade da atividade fungicida da *A. millefolium*.

Ribeiro *et al.* (2010) encontraram valores para a CIM do óleo essencial de *A. millefolium* que tornam esta planta um fitoterápico com importante potencial para uso antifúngico, especialmente para candidíase cutânea.

Nas flores da *Achillea millefolium* foram identificados lipídios, resinas e taninos (FALK, *et al.*, 1975; IVANOV e YANKOV, 1967).

Muitos dos seus efeitos foram explicados após o conhecimento de sua composição química. Por exemplo, aquileína, um alcalóide, é um agente hemostático ativo, tujona, também encontrada em outras plantas, é um abortivo e, possivelmente, responsável pelo uso desta planta no tratamento de problemas relacionados com o aparelho reprodutor feminino. A analgesia resulta de derivados do ácido salicílico, eugenol, mentol e outros componentes presentes no óleo volátil. Taninos, esteróis, triterpenos e substâncias do óleo volátil, como cânfora, azuleno, sesquiterpenos e mentol possuem atividade antiinflamatória e flavonóides com atividade espasmódica (CHANDLER *et al.*, 1982).

Variações na composição do óleo essencial da *Achillea millefolium* vêm sendo estudadas em alguns países da Europa. Um total de 102 componentes foram identificados. Quantitativamente os mais importantes foram: sabineno, beta-pineno, 1.8 cineole, artemísia, quecetona, linalool, alfa-tujona, beta-tujona, cânfora, borneol, fenchyl acetato, bornil acetato, (E)-beta-cariofileno, germacrene D, óxido

cariofilênico, beta bisabolol, delta-cadinol e camazuleno (HAGGAG , 1975; ORAV *et al.*, 2006).

Uma análise do aroma e dos compostos fenólicos foi realizada com diferentes espécies de *Achillea* que cresceram juntas em várias províncias do Iran. Mais de 70 componentes foram determinados. Amostras de flores de todas as espécies continham 2-metilbutanal, alfa-pineno, alfa-tujona, camphene, hexanal, beta-pineno, e 1,8-cineole. Os maiores constituintes das partes aéreas da planta foram: alfa-pineno, camfeno, DL-limoneno, e 1,8-cineole (DOKHANI *et al.*, 2005).

A *Achillea* tem sido empregada popularmente no tratamento de hemorragias, úlceras, diarreia, câncer, tumores, condilomas, verrugas, leucorréia, gripe, pneumonia, etc. É também considerada abortiva, contraceptiva, anti-hemética, cicatrizante, analgésica, anti-inflamatória, anti-térmica e anti-helmíntica (CHANDLER *et al.*, 1982). Tem sido usada homeopaticamente como antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, antiedematoso (ISAAC *et al.*, 1999; SWEETMAN, 2002). Entretanto, os estudos dessas propriedades ainda não são conclusivos (JORGE *et al.*, 1999)

A atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e do extrato metanólico da *Achillea* tem sido estudado. O extrato metanólico da *Achillea* tem mostrado atividade antioxidante. Já o seu óleo essencial tem evidenciado atividade antimicrobiana *in vitro* para *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida Albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter iwofii* e *Candida Krusei* (CANDAN *et al.*, 2003; LUIZ *et al.*, 2006).

A atividade fungicida de extratos brutos e do óleo essencial de *Achillea* e outras plantas em fungos *Didymella bryoniae* tem sido verificada *in vitro* por meio da observação de germinação de esporos e crescimento micelial. Os resultados tem evidenciado uma inibição de 50% do crescimento micelial e análises envolvendo microscopia eletrônica têm revelado alterações no padrão de crescimento das hifas na presença do óleo essencial da *Achillea* (FIORI *et al.*; 2000).

A eficácia antiulcerogênica do extrato aquoso de *Achillea* tem sido também avaliada após exposição aguda da mucosa gástrica de ratos Wistar por etanol e indometacina, bem como lesões gástricas crônicas provocadas por ácido acético. Os resultados mostraram um potencial antiulcerogênico das partes aéreas da *Achillea* sem sinais relevantemente tóxicos, mesmo submetendo-se a exposições crônicas por longo tempo (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

A capacidade hepatoprotetora e efeitos antiespasmódicos do extrato alcoólico da *Achillea* têm sido também estudados, onde o emprego do extrato bruto reduziu a mortalidade em 40%. Os efeitos hepatoprotetores do extrato bruto da *Achillea* foram mais fortemente verificados com base na histopatologia do fígado, a qual evidenciou aumento da arquitetura, ausência de congestão parenquimal, diminuição de células edematosas e apoptóticas (YAEESH *et al.*, 2006).

Diferentes espécies de *Achillea* têm sido usadas no tratamento de desordens gastrointestinais e hepatobiliares na medicina européia tradicional, onde em fígados de rato, o efeito colerético de frações de *Achillea* comparado com a cinarina, principal componente colerético da *Cynara scolymus* tem sido estudado. O extrato da planta estimulou um fluxo biliar mais eficientemente que o simples composto cinarina (BENEDEK *et al.*, 2005).

Com relação à atividade antiinflamatória, foram feitos estudos comparativos usando um gel contendo extrato da planta e *Ruscus* e diclofenaco sódico (diclosal emugel) em edemas induzidos por carragenan em patas de ratos albinos. Os resultados mostraram que a redução do edema pelo extrato de *Achillea* e *Ruscus* foi de aproximadamente 48% enquanto que o uso do diclosal reduziu o edema em 47% (MASWADEEH *et al.*, 2006).

O extrato de flores de *Achillea* inibiu o crescimento de *Streptococcus* beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (DETTTER, 1981).

A *Achillea* tem sido também considerada tradicionalmente como abortiva, contraceptiva e estimulante de contrações uterinas, onde estudos com fêmeas de ratos grávidas têm sido realizados administrando oralmente o extrato da *Achillea* em diferentes fases da gestação. Os resultados mostram uma redução no peso fetal e aumento no peso placentário, sugerindo que o consumo da *Achillea* seja contraindicado na gestação, até que maiores investigações posteriores sejam realizadas (BOSWELL-RUYS *et al.*, 2003). A toxicidade do extrato aquoso das folhas da *Achillea* tem sido também empregado em fases reprodutivas de ratos machos, onde doses orais diárias do extrato aquoso foram aplicadas por 90 dias, sendo observado o peso dos órgãos reprodutores, além do número de espermatozóides, espermátides e a morfologia do espermatozóide. Um significativo aumento na porcentagem de espermatozóides anormais no grupo tratado com doses mais altas do extrato, mas sem outras alterações no restante das fases reprodutivas foi observado. Além disso, uma possível atividade antiestrogênica do extrato da

*Achillea* após 3 dias de tratamento em fêmeas de ratos não evidenciou um efeito uterotrópico significativo (DALSENTER *et al.*, 2004).

Em outro experimento, o extrato de folhas não alterou o tempo do primeiro acasalamento, fertilidade e o tamanho das crias (BARNES *et al.*, 1979).

Ainda com relação à atividade contraceptiva da *Achillea*, estudos têm mostrado atividade estrogênica do extrato bruto das partes aéreas da planta, onde foram observados as seguintes manifestações: esfoliação de células germinativas imaturas, necrose de células germinativas e vacuolização dos túbulos seminíferos. Animais tratados com o extrato tiveram um aumento no número de metáfases no epitélio germinativo que poderia ser devido às substâncias citotóxicas ou estimuladoras da proliferação celular (MONTANARI *et al.*, 1998; INNOCENTI *et al.*, 2007).

Casos de dermatite alérgica quando em contato com *Achillea* têm sido descritos desde 1899. Embora 10 lactonas sesquiterpenos e 3 polinas tenham sido previamente identificados, os sensibilizadores da *Achillea* não haviam ainda sido detectados. O principal sesquiterpeno sensibilizante identificado em experimentos com porcos guinea foi chamado alfa-peroxyachifolide. De 1985 – 1990, mais de 50% dos pacientes sensíveis à *Achillea* reagiram a testes com extrato etanólico da planta (HAUSEN *et al.*, 1991, RUCKER *et al.*, 1991).

A ação antitumoral desta planta tem sido estudada e três novos sesquiterpenóides, ácido achimílico A, B e C têm sido isolados, assim como metil ésteres. Os componentes se mostraram ativos contra células leucêmicas de ratos P-388 *in vivo* (TOZYU *et al.*, 1994).

O flavonóide casticina, derivado da *Achillea*, foi investigado pelo seu mecanismo de ação antitumoral, sugerindo a sua utilização na terapia do câncer (HAIDARA *et al.*, 2005).

A atividade fotoprotetora tem sido também investigada. Extratos etanólicos flores e folhas secas não sendo significativa a absorção da *Achillea* para a faixa de radiação UV entre 290-400nm, sendo encontrada uma absorvância muito baixa (SOUZA *et al.*, 2006).

Na busca de alternativas menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, custos mais baixos, o uso de extratos de plantas apresenta-se bastante promissor, pois apresentam em sua composição substâncias com atividade antimicrobiana (VENTUROSOSO *et al.*, 2011).

Frequentemente tem sido relatado o controle de fitopatógenos, *in vitro* e *in vivo*, com o uso de extratos de planta (LAMEIRA, 2007; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2002; VENTUROSOS, 2009; WANG *et al.*, 2010).

Stangarlin *et al.* (1999) verificaram que o extrato bruto de carqueja inibiu parcialmente o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Scletorium Rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora sp.* e *Colletotrichum graminicola*. Extratos brutos de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), erva-de-são-joão (*Ageratum conyzoides*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e mil-folhas (*Achillea millefolium*) tiveram seu efeito estudado por Fiori *et al.* (2000) e se mostraram eficientes na inibição micelial *in vitro* de *Didymella bryoniae*, agente causador do crostamento gomoso do caule na cultura da melancia.

Rozwalka (2003) avaliando o potencial de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*, observou que o extrato de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) inibiu em 100% o desenvolvimento deste patógeno, apresentando-se como um produto potencial e o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) inibiu o crescimento em 47,49%.

Jun-Young *et al.* (2006) observaram a inibição efetiva do crescimento micelial de espécies do gênero *Colletotrichum* utilizando compostos ativos presentes no extrato metanólico de açafrão (*Curcuma longa*). Siqueira Junior *et al.* (2011) observaram efeito inibitório acentuado dos extratos de sementes de pitomba (*Talisia esculenta*) e extrato de tanchagem (*Plantago major*) sobre o crescimento de *C. gloeosporioides*, *in vitro*. Silva *et al.* (2012) mostraram a inibição total do crescimento de *C. gloeosporioides* utilizando extrato vegetal de cravo-da-índia.

Lima *et al.* 2010, avaliando *in vitro*, o efeito inibitório sobre o crescimento do *L. theobromae*, responsável pela podridão peduncular em manga, verificaram que o alecrim do campo obteve 100% de controle, Jurema Preta (46,45%), aroeira (30,34%), catingueira (21,89%), Maniçoba (15,00%) e Angico (9,12%).

Viana *et al.* (2008), constataram que o extrato etanólico de *S. alata* mostrou atividade para cada parte vegetal no controle micelial de *M. cannonballs*, agente causador do colapso do meloeiro.

Silva *et al.* (2008), trabalhando com extratos de *Costus pisonis*, *Achillea millefolium* e *Plectranthus barbatus*, verificaram que os extratos de folhas e caules de *P. barbatus* apresentaram uma maior inibição do crescimento micelial dos fungos *C. musae*, *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum* comparado aos extratos das

demais espécies testadas, dentre os fungos testados, *C. musae* apresentou maior sensibilidade média aos extratos usados.

Itako *et al.* (2008), ao avaliar a atividade antifúngica e protetora de extratos de plantas medicinais em tomateiro, utilizando *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre *Alternaria solani*, verificaram que os extratos foram promissores para o controle de *A. solani*, agente causal da pinta-preta em tomateiro.

As perdas provocadas por fitopatógenos apresentam significativo efeito na economia, sendo um dos fatores responsáveis por retardar do desenvolvimento da indústria em diversas culturas (DANTAS, 2003). Para diminuir os prejuízos, métodos químicos, físicos e biológicos vem sendo empregados visando o controle deste grupo de doenças (SITTON & PATTERSON, 1992; WILSON & WISNIEWSKI, 1994). Neste contexto, o uso de extratos vegetais tem sido investigado como possível ferramenta no controle de doenças em pós-colheita, com a vantagem de não prejudicar o homem e o meio ambiente (COUTINHO *et al.*, 1999).

Vários estudos sugerem que a propriedade antifúngica dos metabólitos secundários é um fenômeno muito comum e a diversidade de fungos também gerou várias respostas ao interagir com as plantas. A partir de informações coletadas estima-se que existem cerca de 50 famílias de plantas em que compostos foram encontrados com propriedades antifúngicas destacando a família *Asteraceae*, *Leguminosae* e *Brassicaceae* (BOWERS & LOCKE, 1999).

Os compostos secundários pertencem a várias classes de substâncias químicas, como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, alcalóides, terpenos, lignanas, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras. Esses compostos não se distribuem de maneira homogênea nas plantas, ou seja, em uma mesma espécie podem existir diferentes compostos químicos (DI STASI, 1996). Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: hidroxibenzóicos (ácido gálico e ácido vanílico) e hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido ferúlico e ácido cumárico) (REYNERTSON, 2008). Possuem atividade inibitória no crescimento de fungos e produção de micotoxinas dependendo da concentração e estrutura do composto (BAKAN *et al.*, 2003; GRIFIN, 1994; RASSOLI & ABYANEH, 2004). Os flavonóides são compostos por flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas e antocianidinas. Promovem resistência a fungos, insetos e bactérias além de agir como antioxidantes (HARBORNE, 1988; 1994).

Os compostos polifenólicos, um grupo de metabólitos secundários de plantas, amplamente distribuído no reino vegetal, apresentam propriedades antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antialérgica e antitumoral, além de possuírem propriedades antioxidantes e inibirem a atividade de muitas enzimas como as xantinas-oxidases. Acredita-se que a atividade biológica dos compostos polifenólicos seja devido às suas propriedades antioxidantes (SIMÕES *et al.*, 2004; PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; VALKO, 2007).

Atualmente, são conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes (HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004). Os flavonóides são substâncias fenólicas e/ou polifenólicas, derivadas de benzo- $\gamma$ -pirona e isoladas de uma vasta gama de plantas vasculares. Eles atuam em plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visual, repelentes de alimentação, e para a seleção de luz. (PIETTA, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; YAO *et al.*, 2004; DENISOV, 2005).

Os flavonóides são encontrados em sementes, frutos secos, grãos e especiarias, bem como nas bebidas, como vinho (sobretudo vinho tinto), chá, e cevada (em níveis mais baixos) (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004; DENISOV, 2005).

Os flavonóides são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgica, antivirais, antiinflamatórias e vasodilatadoras. Entretanto, o maior interesse, realmente, tem sido na atividade antioxidante dos flavonóides, que é devido a sua capacidade de inibir e/ou reduzir a formação de radicais livres e na capacidade de quelar de metais (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; DENISOV, 2005).

A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo que consiste de 15 átomos de carbono, composto do tipo C6-C3-C6, dispostos em dois anéis aromáticos, que são denominados A e B, conectados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004).

Do ponto de vista biossintético, os flavonóides são derivados do ácido cinâmico (*trans*-4-cumarato), o qual deriva do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. O ácido cinâmico age como percursos na síntese de um

intermediário, ao qual são adicionados três resíduos de malonato e, posteriormente, a estrutura é ciclizada. Subseqüentes hidroxilações e reduções formam diferentes flavonóides (Figura 3) (ACKER *et al.*, 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN & MARTENS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV, 2005).

A grande diversidade de flavonóides é decorrente das variações estruturais, tais como: flavonas, flavanóis, flavonóis, diidrof flavonóis (flavanonas e flavanóis), antocianidinas e isoflavonóides. De modo geral, a grande variabilidade dos flavonóides apresenta: 1) diferenças na estrutura do anel C e no seu estado de oxidação; 2) diferenças no grau de hidroxilação e nas posições dos grupos hidroxila; 3) diferenças na derivatização dos grupos hidroxila, por exemplo, com grupos metila, hidratos de carbono, ou isoprenóides (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004; DENISOV, 2005). Os flavonóides são classificados em grupos pelo nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C. Enquanto os compostos individuais, dentro de um mesmo grupo, são diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B. (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; YAO *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2004).

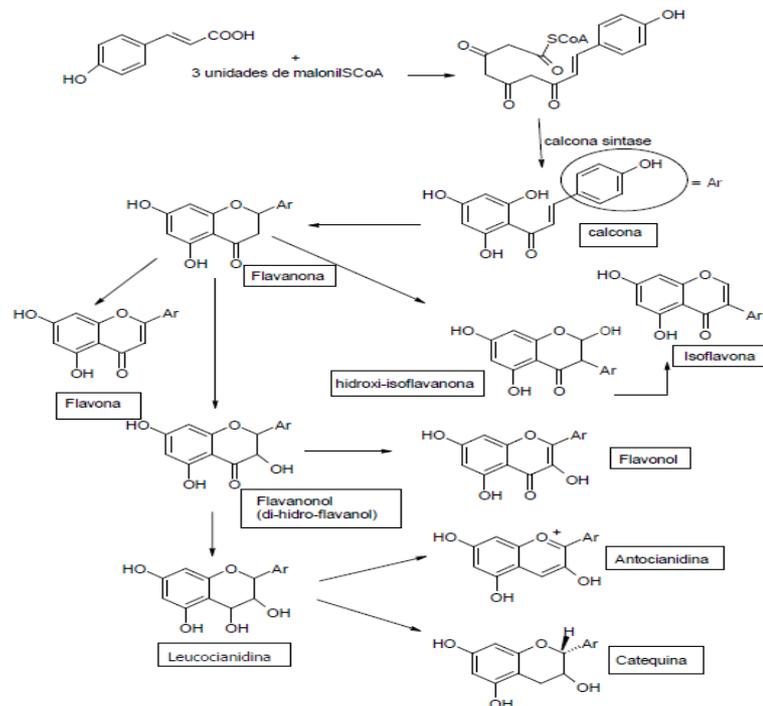


FIGURA 3. Principais rotas biossintéticas dos flavonóides (ACKER *et al.*, 1996; PIETTA, 2000; FORKMANN & MARTENS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; HAVSTEEN, 2002; DENISOV & AFANAS'EV, 2005).

Os flavonóides são, geralmente, hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizado na posição 3. Os glicosídeos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucorhamnose, galactose, ou arabinose (HAVSTEEN, 2002).

As principais aplicações dos flavonóides são na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, o interesse pela indústria farmacêutica é crescente, e justifica-se pelo fato dos flavonóides apresentarem uma série de vantagens em relação a outras drogas, principalmente em termos de não apresentar efeitos colaterais, como ulcerogenicidade.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação, pois apresenta uma série de vantagens como sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para indústria fitoquímica. A cromatografia líquida utiliza uma alta pressão para forçar a passagem do solvente pelas colunas contendo partículas muito finas que proporcionam separações eficientes. (HARRIS, 2001; SKOOG *et al.*, 2005).

A espectrometria de massa (MS) possibilita a identificação de fragmentos característicos para cada molécula e informações sobre o peso molecular de cada molécula. O fundamento desta técnica consiste no fato de que um espectrômetro de massa produz um espectro de massas baseado na estrutura da molécula em estudo. O espectro de massas consiste em uma distribuição das massas dos íons correspondentes ao peso-fórmula de uma molécula, aos fragmentos derivados da molécula, ou a ambos (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

A possibilidade do emprego de técnicas hífenadas ou técnicas acopladas pode ajudar, em parte, os estudos da Fitoquímica. Apesar de extratos vegetais serem misturas complexas de diferentes metabólitos, a análise de frações voláteis ou materiais apolares de superfícies foliares já é, há muito tempo realizada, não sendo necessário muitas vezes, nenhum fracionamento para a total caracterização química do material em estudo. O grande avanço na análise destas misturas decorreu do desenvolvimento de aparelhos de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (GC-MS). Conforme citado acima, a grande limitação desta técnica é a possibilidade de analisarmos apenas substâncias que podem ser

volatilizadas e, em muitos casos, o emprego do impacto eletrônico na geração dos íons limita também o uso para substâncias instáveis. O emprego das primeiras técnicas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) abriu a possibilidade do uso de outros sistemas de detecção, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), eletroquímico e fluorescência, como foi apresentado anteriormente. Nenhum destes sistemas novamente pode ser considerado universal, mas possibilita a análise de matrizes não voláteis e de alto peso molecular. Apesar da limitação da existência de cromóforos na molécula para o detector de UV, o desenvolvimento do arranjo de diodos (DAD – “diode array detector”) estimulou o seu emprego. Contudo, a necessidade de uma maior informação estrutural de cada componente das matrizes analisadas levou ao desenvolvimento de técnicas hífenadas mais modernas, como o acoplamento da HPLC com MS e com ressonância magnética nuclear (RMN). O maior desenvolvimento e emprego das técnicas de ionização diferentes áreas das ciências biológicas, desde a análise de praguicidas no solo até a identificação e caracterização de danos oxidativos ao DNA, passando pela Fitoquímica (PINTO *et al.*, 2002).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Preparação do material vegetal e dos extratos etanólicos**

Flores, folhas e ramos de *Achillea millefolium* foram coletados do plantio realizado na área de cultivo orgânico da Escola Nova Esperança, em São Mateus, norte do estado do Espírito Santo, Brasil. O material foi lavado em água corrente, seco em estufa com temperatura aproximada de 40°C e posteriormente triturada com o auxílio de um moinho de facas (Marconi® - Modelo 340). O pulverizado foi armazenado em saco plástico sobre refrigeração e ao abrigo de luz.

Exsicatas foram confeccionadas, identificadas e depositadas no Herbário Setorial VIES do Centro Universitário Norte do Espírito Santo sob o número de registro 28628.

Para o preparo do extrato etanólico de cada parte da planta por maceração, utilizou-se 50g do pulverizado e adicionou-se 200 mL de etanol P.A. Este extrato foi filtrado a vácuo. O extrato foi concentrado eliminando-se o solvente com o uso de um evaporador rotativo, sob vácuo, em temperatura inferior a 40°C. O extrato concentrado de cada parte da planta foi redissolvido em 5mL de etanol para aplicação em placas cromatográficas.

### **4.2 Preparação das placas cromatográficas, aplicação da amostra e obtenção das frações**

As placas de vidro foram limpas com água e detergente e após com etanol e secas em estufa a 50°C por 30 minutos. Utilizaram-se placas de vidro de 10 por 10 cm recobertas com uma camada de 0,5 mm de espessura de sílica 60 Merck® e água na proporção de 1:1,9 (sílica/água), após foram deixadas em estufa a 110°C por 1 hora.

A aplicação da amostra sobre a cromatoplaça foi feita utilizando-se uma pipeta de 5,0ml a uma distância de 1,0 cm do extremo inferior da cromatoplaça, em seguida deixou-se aproximadamente 1 hora até evaporação completa do solvente e adsorção da amostra na placa. Logo após, a placa foi colocada em uma cuba contendo o solvente de eluição hexano. Utilizou-se 200 ml de solvente. A altura da

fase móvel na cuba foi de aproximadamente 1,0 cm abaixo do ponto de aplicação da amostra. Para a saturação da cuba utilizou-se uma tira de papel de filtro, previamente embebida em hexano, que foi aderida à parede da cuba.

Após a separação, as cinco frações juntamente com a sílica, foram removidas da placa com auxílio de uma espátula e re-solubilizadas com hexano e separadas da sílica por filtração a vácuo. Em seguida as frações filtradas tiveram o solvente evaporado e foram pesadas.

Após o fracionamento dos extratos etanólicos de *A. millefolium* e separação em cinco frações obteve-se quantidades diferentes de cada fração (Tabela 1) que foram utilizadas nos ensaios in vitro, sobre o fungo *C. gloeosporioides*.

TABELA 1. Peso das frações de flor, folha e ramo de *A. millefolium* coletadas em setembro e outubro de 2010, obtidas por CCD.

Parte da planta	Fração 1 (mg)	Fração 2 (mg)	Fração 3 (mg)	Fração 4 (mg)	Fração 5 (mg)
Flor/setembro	3,5	5,2	10,4	1,1	0,5
Folha/setembro	19,5	17,5	13,5	16,3	34,3
Ramo/setembro	16,8	31,4	77,3	27,2	64,7
Flor/outubro	167,4	44,9	22,8	45,1	32,8
Folha/outubro	38,8	43,7	38,2	29,1	34,2
Ramo/outubro	145,8	47,8	25,9	22,6	52,3

#### 4.3 Identificação e quantificação dos fitocompostos via HPLC

Para identificação e quantificação dos fitocompostos foi utilizado o método de Lima (2012), utilizando cromatografia em fase reversa cromatógrafo (Knauer) acoplado a detector conjunto de Arranjo de Fotodiodos (DAD) com sistema de separação por gradiente. O sistema cromatográfico consiste de uma bomba modelo Manager 5000 com injetor manual de volume fixo de 20µL. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna de fase reversa C18 250 x 4,6 mm (Knauer) com pré-coluna de mesma natureza acoplada.

No método cromatográfico, à temperatura ambiente ( $\pm 21^\circ\text{C}$ ) o gradiente de eluição empregado foi com ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) como solvente A,

acetonitrila como solvente B. As condições de eluição foram: 90% A, 10% B (0-5 min), 80% A, e 20% B (5-35 min), 75%A, e 25%B (35-36 min), 90%A e 10% B (36-56 min). As características experimentais para cada composto fenólico são apresentados no Anexo 1

A vazão foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Padrões e amostras foram preparadas em 100% metanol, sonicada por 5 minutos e filtradas em membrana 0,45 µm à vácuo. Os extratos obtidos são apresentados na tabela 2.

TABELA 2. Descrição das frações dos extratos

Fração	Relação m/v
F1	0,5 g / 5,00 ml metanol
F2	0,3401 g / 3,40 ml
F3	0,2810g / 2,81 ml
F4	0,3527g /3,52 ml
F5	0,5g / 5,00 ml

#### 4.4 Identificação e quantificação dos fitocompostos via GC-MS

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um Cromatógrafo gasoso da HP 6890 acoplado a um espectrômetro de Massas HP 5973 (CG/MS), com Injetor automático HP 6890. Coluna HP-5MS (Crosslinked 5% de PH ME Siloxane)- Temperatura máxima de 325 °C - (30mx0.32mm., 0.25µm). Fluxo de gás Hélio de 2mL/min, pressão de 5.05psi. Temperatura do injetor 250 °C; Seringa de 10µL, com injeção de 1µL; Temperatura inicial do forno de 70 °C por 1 min e após aquecimento de 12 °C por min até 280 °C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizado impacto de elétrons de 70eV no espectrômetro de Massas.

#### 4.5 Avaliação da atividade de frações do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* em diferentes concentrações sobre *C. gloeosporioides*

Foram repetidos os procedimentos para obtenção das frações do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro. Em seguida foram realizados os ensaios com essas frações em diferentes concentrações. Cada fração

obtida a partir do extrato etanólico de *A. millefolium* foi diluída em dimetilssulfóxido (DMSO) em quantidade necessária para a obtenção das concentrações desejadas. O extrato diluído em DMSO foi adicionado imediatamente em Erlenmeyer contendo 30mL de BDA fundente, homogeneizado e vertido em três placas de Petri estéreis. Placas contendo BDA com DMSO serviram como controle negativo. Após resfriamento e solidificação do meio, um disco de 6mm de diâmetro de micélio *C. gloeosporioides*, com sete dias de repicado foi colocado no centro de cada placa de Petri, as quais foram vedadas com filme PVC e mantidas em BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após cinco dias, o crescimento radial do fungo foi avaliado com auxílio de uma régua milimetrada, medindo-se o diâmetro da colônia formada em dois sentidos ortogonais.

#### **4.6 Avaliação da atividade de frações do extrato etanólico das partes de *A. millefolium* sobre *C. gloeosporioides***

Cada fração obtida a partir do extrato etanólico de *Achillea millefolium* foi diluída em 150 $\mu\text{L}$  de dimetilssulfóxido (DMSO). O extrato diluído em DMSO foi adicionado imediatamente em Erlenmeyer contendo 30mL de BDA fundente, homogeneizado e vertido em três placas de Petri estéreis. Placas contendo BDA com DMSO serviram como controle negativo. Após resfriamento e solidificação do meio, um disco de 6mm de diâmetro de micélio *C. gloeosporioides*, com sete dias de repicado foi colocado no centro de cada placa de Petri, as quais foram vedadas com filme PVC e mantidas em BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após cinco dias, o crescimento radial do fungo foi avaliado com auxílio de uma régua milimetrada, medindo-se o diâmetro da colônia formada em dois sentidos ortogonais.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Separação das frações

Após a aplicação dos extratos e eluição dos compostos, observou-se a separação das frações dos extratos (Figura 4), independentemente da parte da planta, ou seja, flor, folha e ramo apresentaram fracionamento semelhantes.

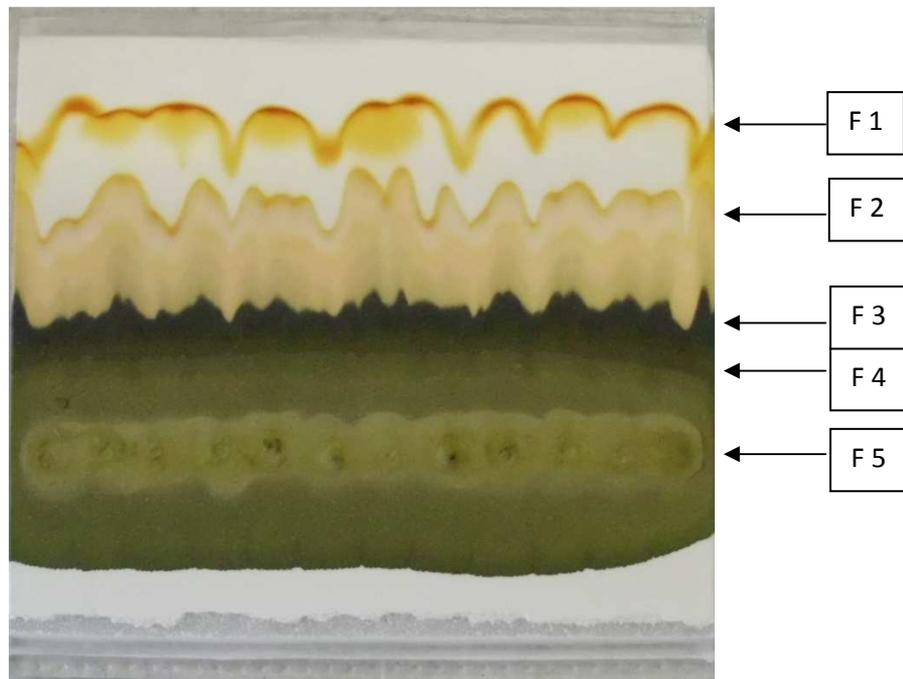


FIGURA 4. Placa cromatográfica de sílica-gel após o fracionamento do extrato etanólico de *A. millefolium*.

### 5.2 Identificação e quantificação dos fitocompostos

A partir da comparação dos tempos de retenção e GC dos padrões e amostras das frações do extrato, observou-se nas análises químicas a presença de diferentes compostos pertencentes ao metabolismo secundário, nas diferentes frações do extrato etanólico da flor de *A. millefolium* coletada em outubro conforme apresentados nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9.

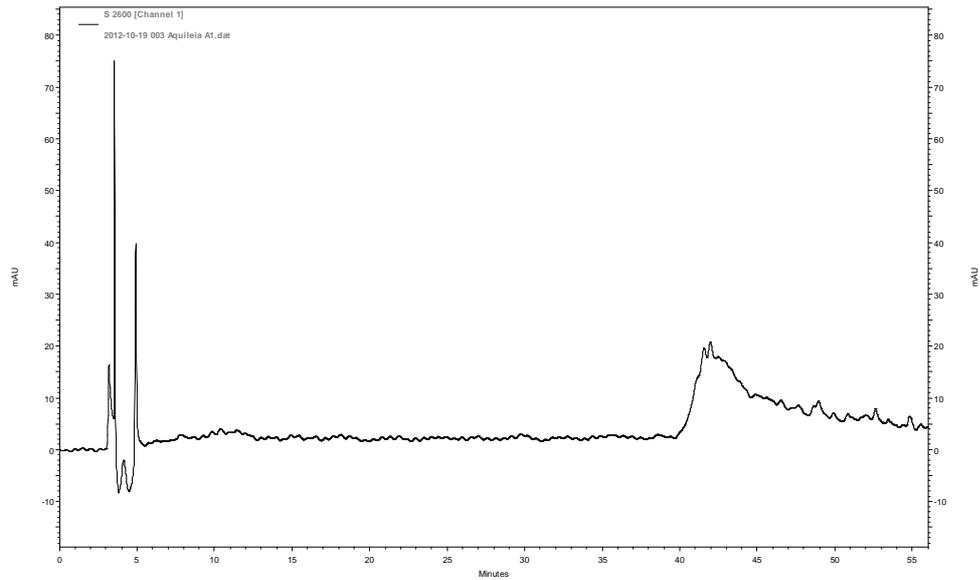


FIGURA 5. Cromatograma em 254 nm da fração F1 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010.

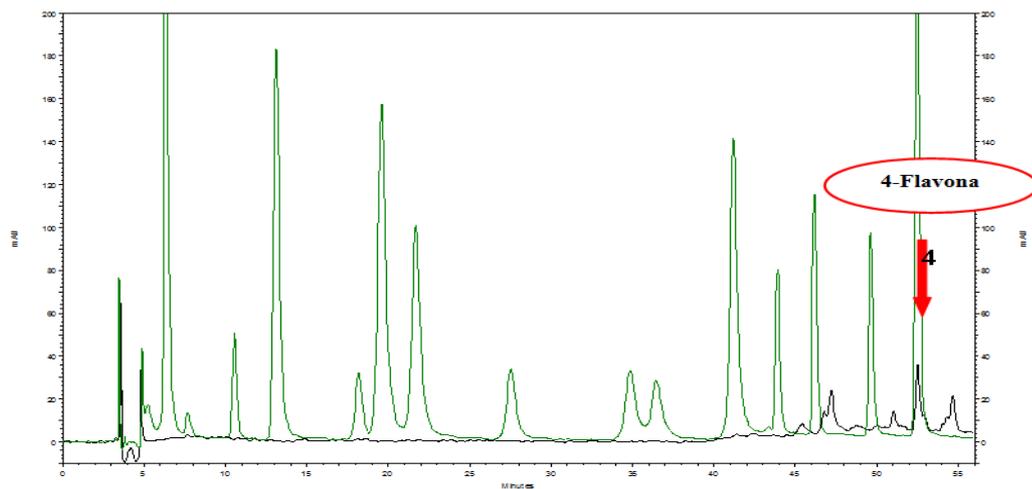


FIGURA 6. Cromatograma em 320nm da fração F2 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010. A linha verde representa a amostra padrão e a linha preta representa a amostra analisada.

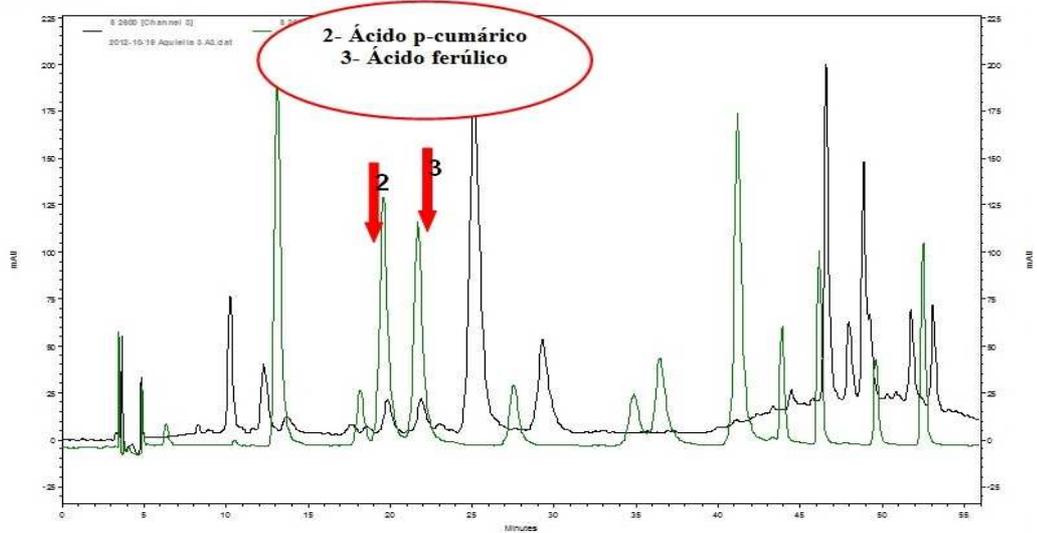


FIGURA 7. Cromatograma em 320nm da fração F3 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010. A linha verde representa a amostra padrão e a linha preta representa a amostra analisada.

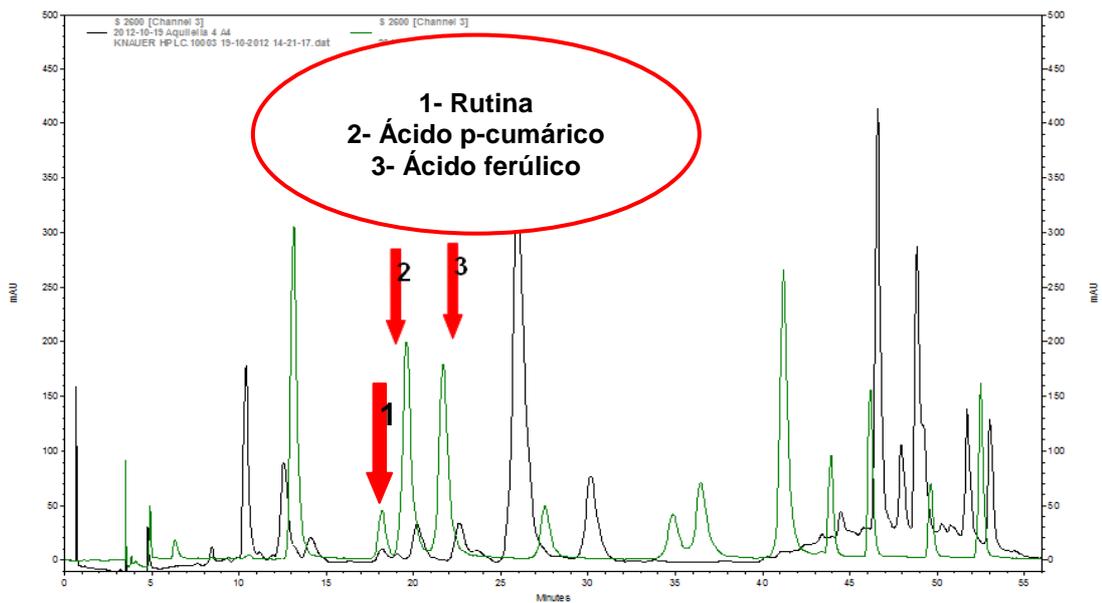


FIGURA 8. Cromatograma em 320nm da fração F4 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010. A linha verde representa a amostra padrão e a linha preta representa a amostra analisada.

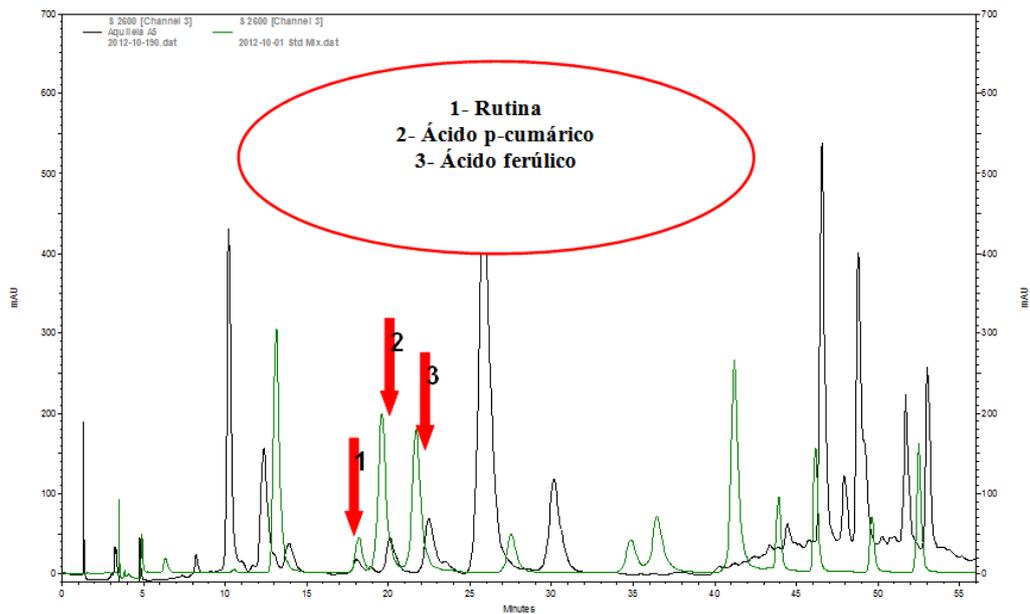
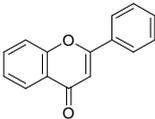
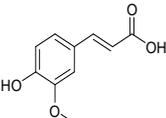
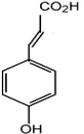
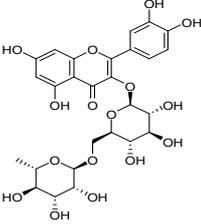


FIGURA 9. Cromatograma em 320nm da fração F5 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010. A linha verde representa a amostra padrão e a linha preta representa a amostra analisada.

Os compostos identificados foram quantificados e encontram-se apresentados juntamente com o tempo de retenção, a área da amostra padrão, área da amostra analisada e a concentração (Tabela 3). A caracterização química baseou-se na análise do tempo de retenção, da adição de padrão para ratificar o tempo de retenção adaptado de Lima, 2012. Medidas dos extratos etanólicos foram realizadas via GC-MS e ratificaram a presença dos compostos identificados via HPLC.

TABELA 3. Relação dos compostos identificados nas frações do extrato etanólico da folha de *A. millefolium*, o tempo de retenção, a área do padrão utilizado na identificação e da amostra e suas respectivas concentrações

COMPOSTOS IDENTIFICADOS	TR	Área/padrão	Amostra	Concentração mg% (100mL)
Flavona 	52,5 min	4.853.419	(2) 623.845	128
Ácido ferúlico 	21,7 min	64.344.420	(3) 1.173.055 (4) 2.269.517 (5) 670.595	18 35 10
Ácido p-cumárico 	19,6 min	6.773.633	(3) 1.262.887 (4) 2.883.950 (5) 1.173.567	186 426 173
Rutina 	18,2 min	1.228.134	(4) 1.405.399 (5) 1.314.976	1144 1070

A análise por cromatografia em fase reversa das frações do extrato da folha de *A. millefolium* revelou a presença de compostos que podem ser distribuídos em duas principais classes: compostos fenólicos e flavonóides. Na fração F1 não foi identificada nenhuma substância. A fração F2 apresentou apenas flavona em sua composição. As frações F3, F4 e F5 apresentaram concentrações distintas de ácido ferúlico e ácido p-cumárico, sendo que as frações F4 e F5 também possuem rutina em sua composição. A atividade farmacológica dos fitocompostos detectados nas frações etanólicas de *A. millefolium* encontra-se descrita na tabela 4.

Os dados estão de acordo com a triagem fitoquímica realizada por Peres *et al.* (2008) que mostrou a presença de compostos fenólicos simples, taninos e flavonóides em extratos aquosos e etanólicos das partes aéreas (flor e caule) *A. millefolium*.

TABELA 4. Atividade farmacológica dos fitocompostos detectados nas frações etanólicas de *A. millefolium*.

Fitocomposto	Atividade
Flavona	São protetores químicos que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que àqueles visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação (FERREIRA <i>et al.</i> , 2008).
Ácido Ferúlico	O ácido ferúlico é um potente antioxidante fenólico encontrado em altas concentrações em plantas, principalmente no farelo de arroz e de milho. Possui um alto potencial fotoprotetor, age como uma barreira de membrana celular, impedindo a atividade de radicais livres e minimizando os efeitos dos dímeros de timina que são agentes carcinogênicos resultantes da exposição da pele à radiação UV. Nos últimos anos o potencial fotoprotetor do ácido ferúlico tem sido amplamente estudado. Dados científicos mostram que a aplicação tópica do ácido ferúlico inibe a formação de eritema provocado pela exposição da pele aos raios ultravioletas B (UVB) (Saija <i>et al.</i> , 2000). Além disso, a ação fotoprotetora é acompanhada pela sua atividade antioxidante. O ácido ferúlico age inibindo a formação dos dímeros de timina no DNA das células da pele expostas à radiação UV, diminuindo o processo carcinogênico (LIN <i>et al.</i> , 2003).
Ácido p-cumárico	Atividade antioxidante em razão do seu potencial como preventivo contra o câncer e doenças do aparelho circulatório bem como pela sua abundância e diversidade estrutural (LUTHRIA, <i>et al.</i> , 2006).
Rutina	Sua ação é de antfragilidade capilar, fortalecendo os capilares, reduz os sintomas de hemofilia e previne edemas nas pernas. Sua carência provoca o aparecimento de microvarizes e problemas vasculares (DEWIK, 2002).

### 5.3 Ensaio com frações do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* em diferentes concentrações

A concentração efetiva para a inibição do crescimento micelial em 50% foi estimada através de equação da regressão linear (tabela 5).

TABELA 5. Equações de regressão, valores de ED<sub>50</sub> (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* a frações do extrato etanólico de *A. millefolium*).

Frações	Equações de regressão	ED <sub>50</sub> (ppm)
F2	NS	–
F3	$Y = 5,425 - 0,002516x$	1003,58
F4	$Y = 5,721 - 0,003926x$	705,81
F5	Ns	–

De acordo com os resultados obtidos na análise química, a fração F1 por não apresentar detecção de nenhuma substância, não foi incluída nos testes.

Avaliando os resultados (Tabela 5), conclui-se que para as frações F2 e F5, o modelo linear de regressão não é estatisticamente significativo, ou seja, a concentração não pode explicar o comportamento da variável crescimento. Para as frações F3 e F4, o modelo linear de regressão foi aceito, indicando que ao aumentarmos a concentração, o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* diminui. Verifica-se esse fato pela reta do gráfico da regressão (Figura 10 e Figura 11).

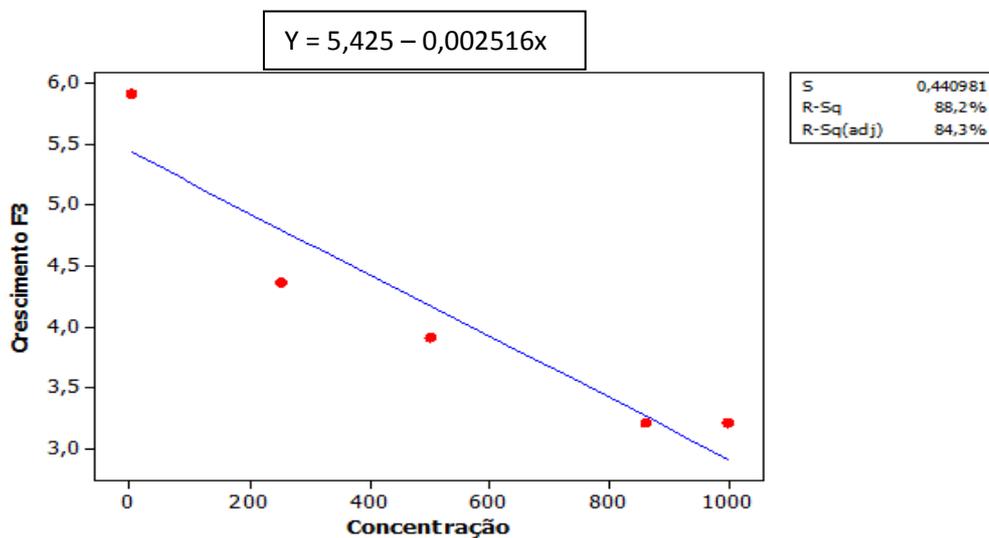


FIGURA 10. Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* sob influência de diferentes concentrações da fração F3 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010.

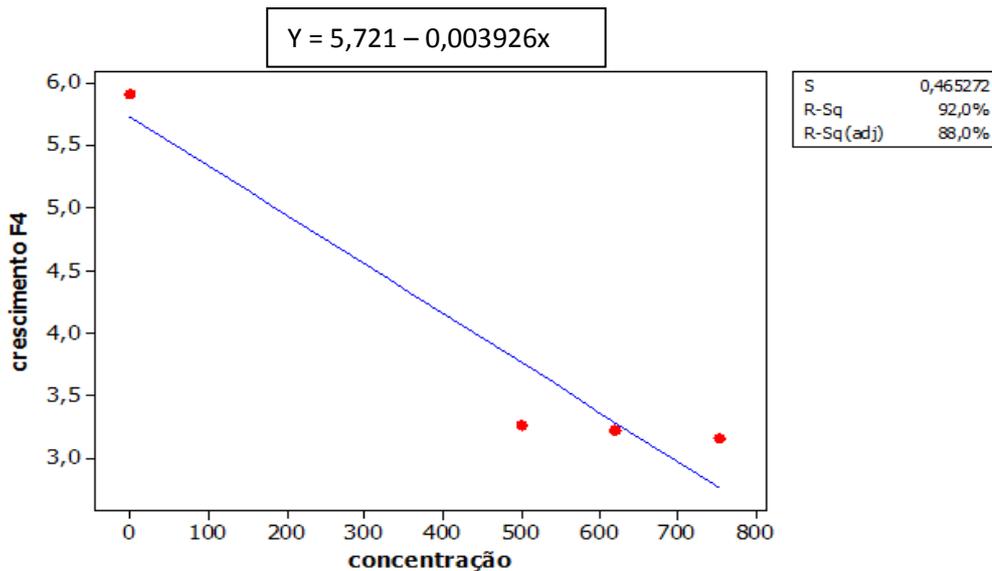


FIGURA 11. Crescimento micelial de *C. gloeosporioides* sob influência de diferentes concentrações da fração F4 do extrato etanólico da folha de *A. millefolium* coletada em outubro de 2010.

O efeito no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* submetido ao meio de cultura com adição das frações F3 e F4 do extrato etanólico de *A. millefolium* apresentaram respostas semelhantes com o aumento das concentrações utilizadas, verificando-se menor diâmetro da colônia fúngica nas maiores concentrações.

O grau de inibição *in vitro* está diretamente correlacionado com a concentração de extratos de plantas em meio de BDA. Os autores observaram inibição micelial completa de *C. musae* quando utilizaram as maiores concentrações, de 25 e 50% de extrato de *Solanum torvum* L. (THANGAVELU *et al.*, 2004).

Somchit *et al.*, (2003) verificaram em diferentes experimentos que o uso de diferentes concentrações interferem na variação dos resultados. Vários trabalhos constataram a eficácia da utilização de concentrações mais elevadas do extrato das diferentes partes de *S. alata*, no controle de microorganismos (KHAN *et al.*, 2001; RANGANATHAN & BALAJEE, 2000; SOMCHIT *et al.*, 2003).

#### 5.4 Atividade dos extratos etanólicos de *A. millefolium* em função da parte da planta e do mês de coleta

Observando os resultados obtidos constata-se que houve variação entre os meses de coleta e as partes da planta utilizadas.

Verifica-se na figura 12 que o crescimento do *C. gloeosporioides* no mês de outubro diferiu estatisticamente do crescimento em setembro, sendo outubro o mês em que o crescimento é menor.

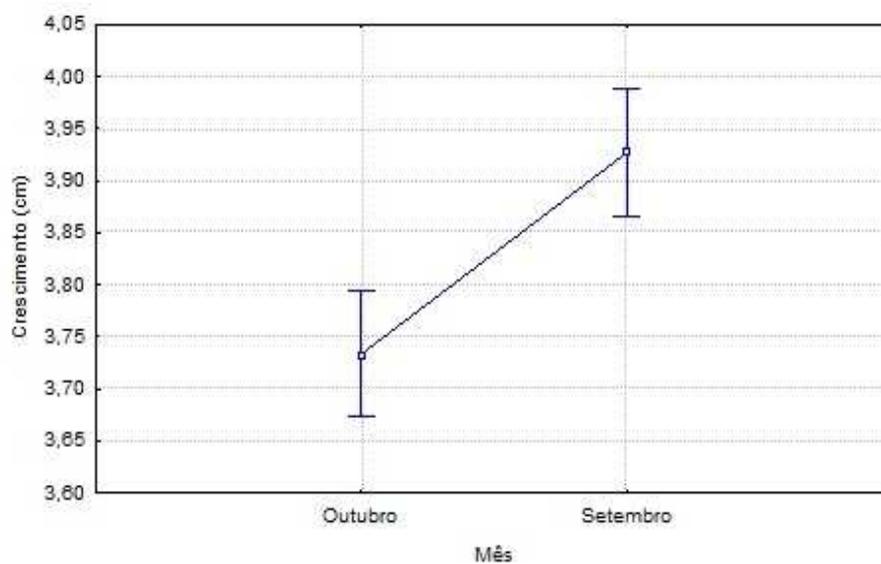


FIGURA 12. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função dos meses de coleta.

Ao analisar a taxa de crescimento de *C. gloeosporioides* utilizando extratos de diferentes partes da planta constata-se que estatisticamente que o crescimento utilizando extratos de flor e folha são iguais e que eles diferiram estatisticamente do ramo, onde o crescimento foi maior (Figura 13).

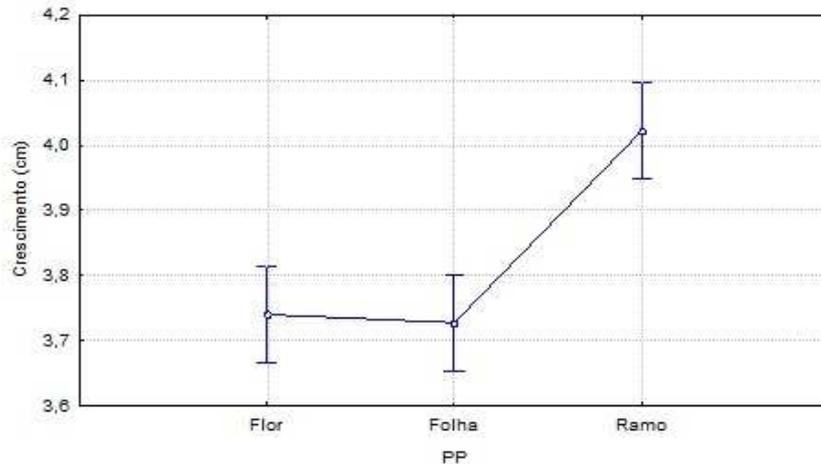


FIGURA 13. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função das partes da planta.

Ao analisar as variações do crescimento em função das partes da planta e dos meses de coleta encontramos dados concordantes com a literatura. Entre os fatores que influenciam nos teores de princípios ativos em plantas, destacam-se: o fator genético, as condições de cultivo, colheita e processamento do material (BACCHI, 1996; FURLAN, 1996; HERNÁNDEZ, 1996). Desta forma, cuidados durante a colheita como época do ano, hora do dia, estágio de desenvolvimento e escolha da parte botânica devem ser levados em consideração para não influenciar no potencial fungicida das substâncias (GARCIA *et al.*, 2012).

Bezerra *et al.* (2008), avaliando a produção e composição da macela em função da época de colheita, concluíram que a produção de biomassa e de capítulos florais cresceu linearmente com o avanço das épocas de colheita e que caule, folhas e capítulos foram detentores de maiores rendimentos de extratos etanólico e clorofórmico que as raízes.

Ao observarmos o crescimento em função das frações (F1, F2, F3, F4 e F5), constata-se que as frações F4 e F5 apresentaram um crescimento radial do *C. gloeosporioides* semelhante e menor em relação aos demais. Percebe-se também dois grupos de crescimento micelial semelhantes: F1, F2 e F3 e o outro grupo F4 e F5 (Figura 14).

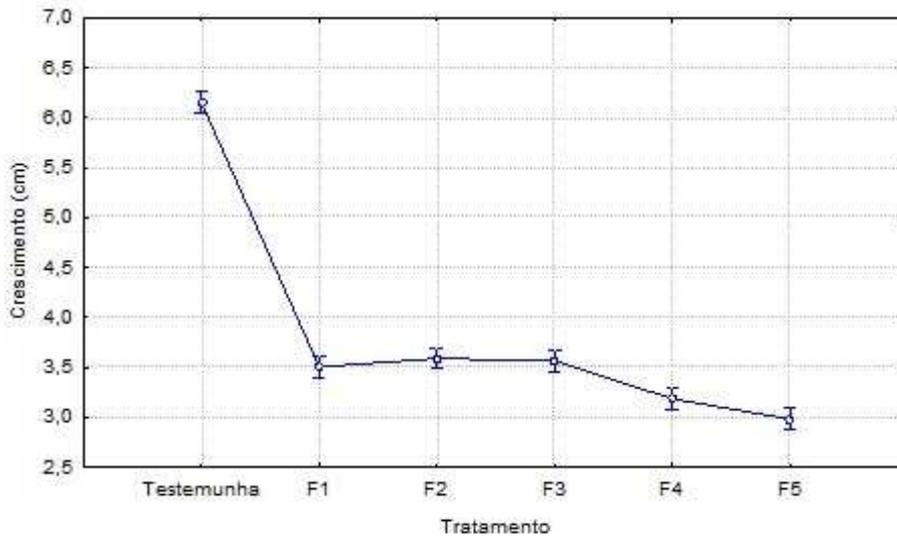


FIGURA 14. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função das frações (F1, F2, F3, F4 e F5).

Constata-se para a interação entre os meses e as partes da planta, que o ramo apresenta crescimentos diferentes em relação aos meses. Verifica-se que a folha e a flor exibiram um crescimento semelhante para os dois meses e menores quando comparados ao ramo (Figura 15).

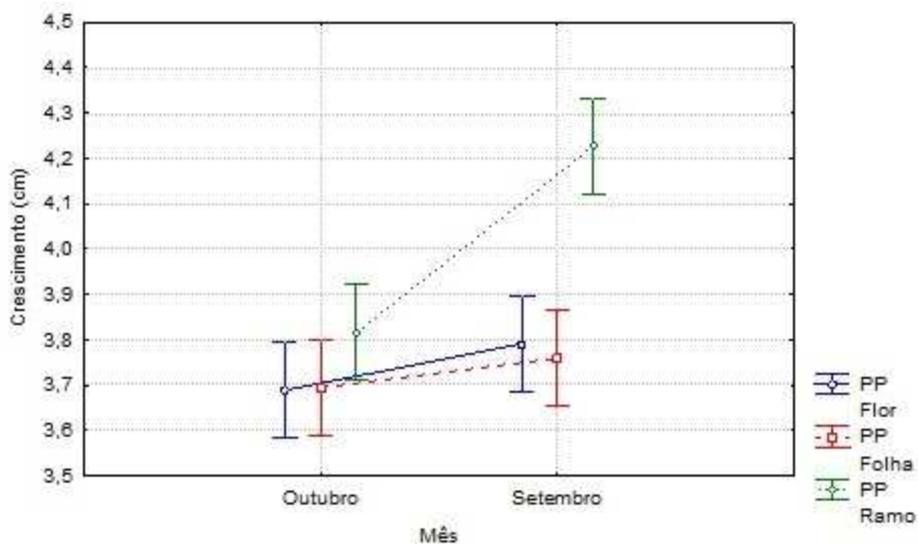


FIGURA 15. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função dos meses de coleta e partes da planta.

Considerando a interação entre os meses e as frações, verifica-se que as frações F4 e F5 apresentaram o menor crescimento micelial. Os tratamentos F1, F4 e F5 apresentaram um crescimento micelial igual para os dois meses, os demais

obtiveram uma média de crescimento micelial diferenciada em relação aos meses (Figura 16).

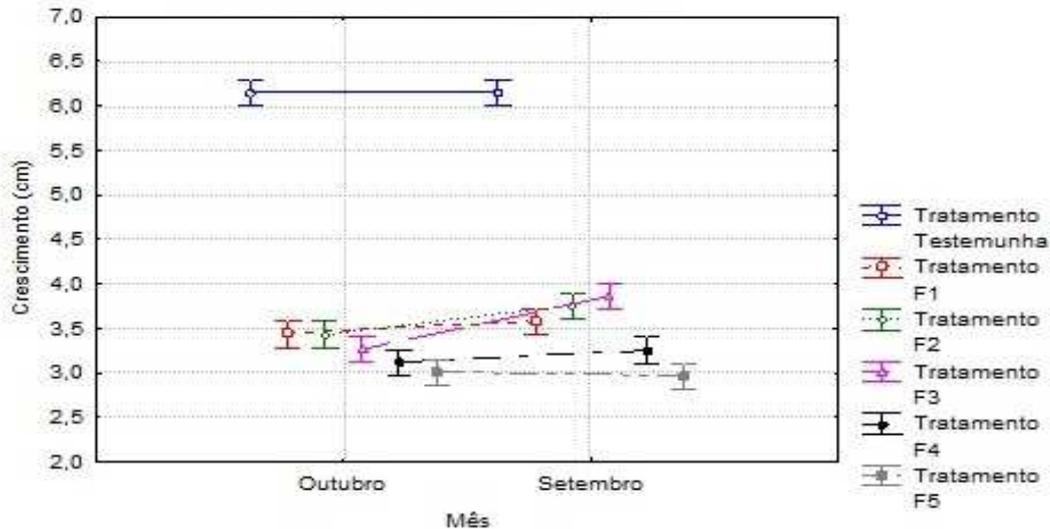


FIGURA 16. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função das frações dos extratos e meses de coleta.

A interação entre as partes da planta e as frações apresentou crescimento diferenciado. Observa-se que as F4 e F5 promoveram os menores crescimentos e não se diferem em relação às partes da planta. Apenas as frações F2 e F3 apresentaram comportamento diferente em relação às partes da planta (Figura 17).

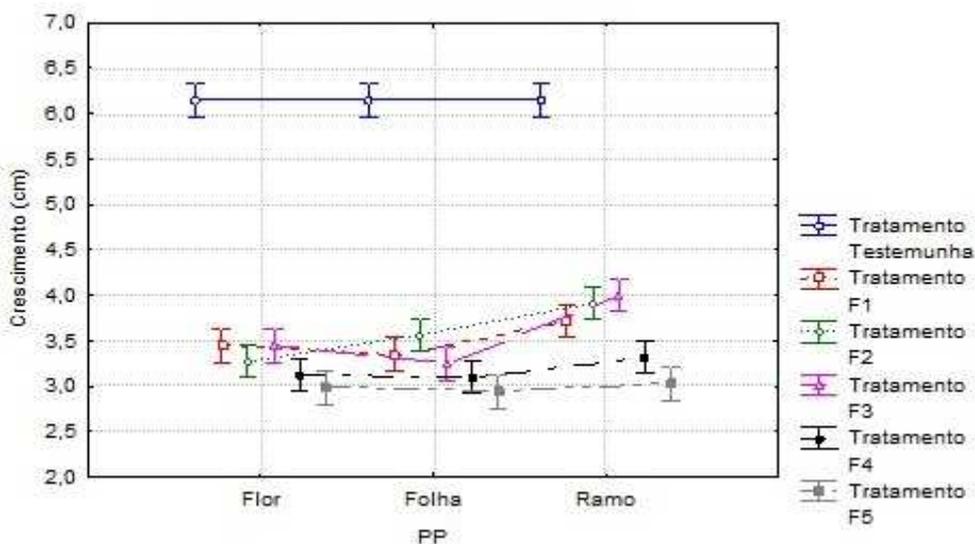


FIGURA 17. Variação do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em função das frações dos extratos e partes da planta.

A variação nos resultados pode estar associada à parte da planta utilizada, às condições edafoclimáticas em que as plantas foram cultivadas ou à época do ano em que foram coletadas. Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura, os quais o autor afirma que a concentração dos princípios ativos não se apresentam uniforme no decorrer do ciclo da planta, nem em todas as partes, podendo apresentar diferenças conforme o cultivo, a colheita e o processamento do material vegetal (DI STASI, 1996). Gobbo-Neto e Lopes (2007), também afirmam que a quantidade e a natureza dos constituintes das plantas não é fixa durante o ano.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho, obteve-se os extratos etanólicos de flores, folhas e ramos de *Achillea millefolium* e o fracionamento dos mesmos para a determinação da atividade antifúngica de frações dos extratos etanólicos das partes (flor, folha e ramo) de *A. millefolium* coletadas em meses distintos..

O estudo da atividade de frações do extrato etanólico das partes de *A. millefolium* coletadas em dois meses diferentes revelou a inibição parcial do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, observada *in vitro*. Verificou-se a existência de ação fungitóxica em maior concentração e em compostos nas frações F4 e F5 da flor e folha coletadas em outubro.

A variação nas concentrações das frações do extrato etanólico da folha de aquilea, permitiu verificar que à medida que se aumentava a concentração, o crescimento do fungo diminuía. As análises químicas destas frações, realizadas via HPLC e GC, detectaram a presença de ácido cumárico, ácido ferúlico e rutina nas frações F4 e F5. Isto demonstra que as substâncias do metabolismo secundário de plantas medicinais são uma vasta fonte de moléculas químicas com potencial para o controle de doenças de plantas.

É importante considerar a sazonalidade e a parte da planta coletada para caso tenha-se por objetivo o aumento da atividade fungicida da planta estudada.

## REFERÊNCIAS

- ACKER, S. B. E. V. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. v.20, p.331-342, 1996.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**. Buenos Aires, Editora Isis, 1998. p. 725-729.
- ALVARENGA, S. A. V.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P.; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae. Characterization of tribes by principal component analysis. Chemometrics and Intelligent **Laboratory Systems**. v.56, p.27-37, 2001.
- BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, 1996. p.170-186.
- BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection BAILEY, A. J. & JEGER, J. M. Strategies of *Colletotrichum* species. In: **Colletotrichum: biology, pathology and control**. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. p.88-120. 1992.
- BAKAN, B. et al. Possible role of Plant Phenolics in the Production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different Fractions of Maize Kernels. **Journal and Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.2826-2831, 2003.
- BARNES, C. S. et al. Reversible sterility due to diminished glucose metabolism in male mice treated with 5-thio- D-glucose. **Indian J. Exp. Biol.**, v.17, n.7, p.632-636, 1979.
- BENEDEK, B.; GEISZ, N.; JAGER, W.; THALHAMMER, T.; KEPP, B. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver. **Phytomedicine**, v.19, 2005.
- BENEDEK, B.; GJONCAJ, N.; SAUKEL, J.; KOPP, B. Distribution of phenolic compounds in Middle European taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. **Chem Biodivers**. v.4, p.849–857, 2007.
- BEZERRA A. M. E.; FREITAS J. B. S.; CUNHA A. N.; MEDEIROS FILHO S.; SILVEIRA E. R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**. v.26, p.026-029, 2008.
- BOHLMANN, F. Chemistry of the Heliantheae (Compositae). **Plant Systematics and Evolution**. p.67-65, 1990.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Systematics and evolution within the compositae seen with the eyes of a chemistry. **Plants Systematics and Evolution**. v.171, p.1-14, 1990.

BOSWELL-RUYS, RITCHIE, H.; E.; BROWN-WOODMAN, P. D. Preliminary screening study of reproductive outcomes after exposure to yarrow in the pregnant rat. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* v.68, n.5, p.416-20, 2003.

BOWERS, J. H.; LOCKE, J. C. Effect of Botanical Extracts on the Population Density of *Fusarium oxysporum* in Soil and Control of Fusarium Wilt in the Greenhouse. *Plant Disease*, v.84, n.3, p.300-305, 1999.

BREMER, K. **Asteraceae – Cladistics and classification**. Timber Press. Portland, Oregon. 1994.

CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* sub sp. *Millefolium* Afan. (asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.215-220, 2003.

CAVALCANTI, A. M. ; BAGGIO, C. H. ; FREITAS, C. S. ; RIECK, L. ; de SOUZA, R. S. ; da SILVA-SANTOS, J. E. ; MESIA-VELA, S. ; MARQUES, M.C. Safety and antiulcer efficacy of *Achillea millefolium* L. After chronic treatment in Wistar rats. **J.Ethnopharmacology**. v.107, n.2, p.277-84, 2006.

CHANDLER, R.F. et al. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow ***Achillea millefolium*** compositae. **Economic Botany**, New York, v.36, n.2, p.203-223, 1982. Disponível em: <<http://www.jstor.org/pss/4254376>>. Acesso em: 26 out. 2012.

CHANDLER, R.F. **Herbal medicine: yarrow**. Janvier, 1989.

CORRÊA JR, C. et al. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.

COUTINHO, W. M. et al. Efeitos de extratos de plantas anarcadiácease e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v.23, p.560-568, 1999.

DALSENTER, P. R.; CAVALCANTI, A. M.; ANDRADE, A. J.; ARAUJO, S. L.; MARQUES, M. C. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L.(Asteraceae) in Wistar rats. **Reprod. Toxicol.** v.18, n.6, p.819-23, 2004.

DANTAS, S. A. F. **Doenças fúngicas pós-colheita em frutas de mamão e laranja: ocorrência e indução de resistência com elicitores bióticos e abióticos**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003.

DENISOV, E. T. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2005. 981p.

DETTNER, R. Germination inhibitors as drugs? Growth-inhibitory effect of an extract of chamomile and milfoil flowers. **Pharm. Ztg.**, v.126, n.23, p.1140-1142, 1981.

DEWIK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach.** 2<sup>nd</sup> ed., Chichester, John Wiley & Sons, 2002.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar.** São Paulo: Universidade Paulista, 1996. p.109-127.

DINIZ, L. P.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D. de; CASALI, V. W. D.; SANTOS, R. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.171-179, 2006.

DOKHANI, S.; COTTRELL, T.; KHAJEDDIN, J.; MAZZA, G. Analysis of aroma and phenolic components of selected *Achillea* species. **Plant Foods Hum. Nutr.** v.609, n.2, p.55-62, 2005.

FALK, A. J. et al. Isolation and identification of three new flavones from a *A. millefolium*. **J. Pharm. Sci.**, v.64, n.11, p.1838-1842, 1975.

FAWCETT, C.H.; SPENCER, D.M. Plant chemotherapy with natural products. **A. Rev. Phytopath.**, Palo Alto, v.18, p.403-418, 1970.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica, **Revista Agro@mbiente On-line**, v.2, n.2, p.57-60, 2008.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal Activity of leaf extracts and essential oils of some plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology.**, v.148, p.483, 2000.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Mamão. In:\_\_\_\_\_. **Agriannual 2005: anuário da agricultura brasileira.** São Paulo, 2005. p.371-375.

FORKMANN, G.; MARTENS, S Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Current Opinion in Biotechnology.** n.12, p.155-160, 2001.

FUMAGALI, E. et al. Produção de Metabólitos Secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernae montana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** João Pessoa-PB, v.18, n.4, 2008.

FURLAN, M. R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Unesp, 1996. p.157-167.

GACHOMO, E. W.; KOTCHONI, S. O. Extract from drought-stress leaves enhances disease resistance through induction of pathogenesis related proteins and accumulation of reactive molecules. **Biotechnology**, v.7, n.2, p.273-279, 2008.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A.; Atividade Antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Biosci. J.**, Uberlandia, v.28, n.1, p.48-57, 2012.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, fev, 2007.

HAGGAG, M.Y. Thin layer and gas chromatographic studies on the essential oil from *Achillea millefolium*. **Plant Med.**,v.27, p.361-366,1975.

Haidara, K.; Zamir, L.; Shi, Q. W.; Batist, G. The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. **Cancer Lett.** v.29, 2005.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis**. Chapman and Hall. 288p. 1988.

HARBORNE, J. B. Phenolics. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. **Natural Products**. Their chemistry and biological significance. 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, 1994a. p.361-388.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. n.55, p.481-504, 2000.

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**, 5ª edição, LTC editora, 2001.

HAUSEN, B. M.; BREUER, J.; WEGLEWSKI, J.; RUCKER, G. alfa-Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (*Achillea millefolium* L., Compositae). **Contact Dermatitis**. v.24, n.4, p.274-80, 1991.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v.96, p.67-202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.13, p.572-584, 2002.

HERNÁNDEZ, C. R. **Control alternativo de insectos plaga**. México: Colegio de Postgraduados y Fundación Mexicana para La Educación Ambiental A.C. Tepetzotlan, 1996.

HEYWOOD, V. A.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. **The Biology and chemistry of the compositae**. Acad. Press. London.1977.

INNOCENTI, G.; VERGETO, E.; DALL'ACQUA, S.; CIANA, P.; GIORGETTI, M.; AGRADI, E.; SOZZI, A.; FICO, G.; TOME, F. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. **Phytomedicine**. v.14, n.2-3, p.147-52, 2007.

ISAAC, V. L. B. et al. Atividade antiinflamatória tópica de cremes contendo óleo

essencial de *Achillea Millefolium* L. (Asteraceae). In: Jorge, L.I.F.; Pregnotatto, B. P.; Chicourel, E. L.; Zamariolli, L. A.; Graciano, R. A. S. Anatomy and evaluation of the antimicrobial activity in vitro of yarrow (*Achillea Millefolium* L). **Rev. Cienc. Farm.** n. 20, p. 49-58, 1999.

ITAKO A. T., SCHWAN-ESTRADA K. R. F., TOLENTINO JÚNIOR J. B., STANGARLIN J. R., SILVA CRUZ M. E.; Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais; **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.3, p.241-244, 2008

IVANOV, C.; YANKOV, L. Composition of *A. millefolium*. I. Preparation of the total extracts and composition of the part of the alcoholic extracts soluble in alcohol and water. **God. Vissh. Khimikotekhnol. Inst.**, v.14, n.3, p.195-222, 1967.

JORGE, L. I. F.; Pregnotatto, B. P.; Chicourel, E. L.; Zamariolli, L. A.; Graciano, R.A.S. Anatomy and evaluation of the antimicrobial activity in vitro of yarrow (*Achillea Millefolium* L), **Rev. Cienc. Farm.**; v.20, p.49-58, 1999

JUN-YOUNG, C.; CHO, G. J.; LEE, S.; JANG, K. S.; LIM, H. K.; LIM, C. H.; LEE, S. O.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. Antifungal activity against *Colletotrichum* spp. of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.16, p.280-285, 2006.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v.72, n.5, p.561-564, 2001.

KUHAJEK, J. M.; JEFFERS, S. N.; SLATTERY, M.; WEDGE, D. E. A rapid microbioassay for discovery of novel fungicides for *Phytophthora* spp. **Phytopathology**. v.93, p.46-53, 2003.

LAMEIRA, C. N. **Atividade do óleo-resina de copaifera reticulata Ducke no crescimento micelial in vitro de fitoptógenos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração Produção Vegetal) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

LIBERATO, J.R. & ZAMBOLIM, L. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e fitonematóides em mamoeiro. In ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. v.2. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p.1023-1169. 2002.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, n.6, p.620-625. 2003.

LIMA, F. O. **Estudo Comparativo da Atividade Antirradicalar de Antioxidantes Sintéticos e Naturais Empregando Métodos in vitro e in vivo**, Qualificação de Doutorado, PPGQ/UFSM, 2012

LIMA, J. S.; PEREZ, J. O.; BARROS, P. N.; AZEVEDO, L. C.; MENDES, R. B.; PESSOA, R. A. Ação fungitóxica de extratos vegetais de plantas da caatinga sobre

o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. em *Vitis Vinifera* L. **V CONNEPI**, 2010.

LIN J.Y.; SCLIM M. A., et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and E. **J Am Acad Dermatol** v.48, p.866-874, 2003

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

LUIZ, E. S.; KETYLIN, F. M.; VERA, L. B. I. ; MARCOS, A.C.; HÉRIDA, R.N.S. Extract against *Bacillus subtilis*. **Brasilian Journal of Microbiology**. v.48, p.75-77, 2006.

LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, Krizek, D. T. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, p.771-777, 2006.

MARIN, S. S. D. **Mamão papaya: produção, pós-colheita e mercado**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2004. 82p.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS JE. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV; 2000. 145p.

MONTANARI, T.; de CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. Antiespermatogenic effect of *Achillea millefolium* L. In mice. *Contraception*. 58 (5):309-13, 1998.

OFICINA DE ERVAS, 2006. Disponível em: <<http://www.oficinadeervas.com.br>>. Acesso em: 03 set. 2012.

ORAV, A.; ARAK, E.; RAAL, A. Phytochemical analysis of the oil of *Achillea millefolium* L. FROM VARIOUS European Countries. **Nat. Prod. Res.** v.20, n.12, p.1082-8, 2006

PEREIRA, R. B. **Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora coffeicola* em cafeeiro**. 79 f. Dissertação – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

PERES, R. L.; MORAES, S. C. S.; CARVALHO, C. A.; NASCIMENTO, P. C.; CARVALHO, L. M.; SILVA, M. B.; RAMPELOTTO, P. H.; ROSA, M. B. *Achillea millefolium* – Asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia** v.5, p.101-110, 2008.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v.63, p.1035–1042, 2000.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., E R. A EPIFANIO, Produtos naturais: produtos desafios e perspectivas, **Quim. Nova**, v.25, Supl.1, p.45-61, 2002.

RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S. A. M. Anti-*Cryptococcus* activity of combination

of extracts of *Cassia alata* and *Ocimum sanctum*. **Mycoses**, v.43, n.7/8, p.299- 301, 2000.

REYNERTSON K. A.; YANG H.; YANG B.; BASILE M. J.;KENNELLY E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chem**, v.109, n.4, p.883-90, 2008.

RIBEIRO, D. I.; ALVES, M. S.; FARIA, M. G. I.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, F. B. P.; FERREIRA, G. A.; GAZIM, Z. C. Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) e de *Achillea millefolium* (Asteraceae) cultivadas no noroeste do Paraná **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v.14, n.2, p.103-109, 2010.

ROZWALKA, L.C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. Curitiba. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2003.

RUCKER, G.; MANNS, D.; BREUER, J. Peroxides as plant constituents. 8. Guaianolides peroxides from yarrow, *Achillea millefolium* L., A soluble component causing yarrow dermatitis. **Arch Pharm (Weinheim)**. v.324, n.12, p.974-81,1991.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.** v.199, p.39-47, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUS, M. E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Maringá, v.30, n.2, p.129-137, 2002.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSO, J.O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde**. v.7, n.1, p. 80-86. 2012.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 460 p.

SIMÕES, C. O., SCHENKEL, E. P., GOSMÃO, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004. 1102p.

SIQUEIRA JUNIOR, C. L.; MORAES, T. C.; MARTINS, J. A. B.; FREIRE, M. G..Controle da Antracnose em mamão por extratos vegetais. **Perspectivas online**. v.1, n.1, 2011.

SITTON, J. W.; PATTERSON, M. E. Effect of high carbon dioxide and low-oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 76, p. 992-995, 1992.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Brooks/Cole, 8a edição Norte Americana, 2005. p.678-780

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 128 p., 2010.

SOMCHIT, M. N.; REEZAL, I.; NUR, I. E.; MUTALIB, A. R. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.84, p.1-4, 2003.

SOUZA, T. M.; RANGEL, V. L. B. I.; PIETRO, R. C. L. Rr. Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – SP. **Rev. Bras. Pl. Méd.**, Botucatu, v.8, n. Especial, p.151-154, 2006.

SPRING, O.; BUSCHMANN, H. A Chemataxonomic survey of sesquiterpene lactones in the Helianthinae (compositae). In **Compositae: Systematics. Proceedings of the international Compositae Conference**. Kew, UK. Ed.1. p. 307-311.1994.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. da S; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.2, n.11. 1999.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: The complete drug reference**. 33<sup>a</sup> ed.. London, Pharmaceutical Press: 2002. p.1572.

TATAGIBA, J. S.; LIBERATO, J. R.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.27, p.186-192, 2002.

THANGAVELU, R.; SUNDRARAJU, P.;SATHIAMOORTHYS, S. Management of antracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, n.4, 2004.

TOZYO, T.; YOSHIMURA, Y.; SAKURAI, K.; UCHIDA, N.; TAKEDA, Y.; NAKAI, H.; ISHIL, H. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. **Chem Pharm Bull**, v.42, n.5, p.1096-100, 1994.

VALKO et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p.44–84, 2007.

VENTUROSOSO, L. dos R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja**. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração Produção Vegetal) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2009.

- VENTUROSU, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C.; Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa phytopathol.**, v.37, n.1, 2011.
- VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE, C. C.; MEDEIROS, E. V.; VIANA, F. A.; SILVA, K. M. B. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosporascus cannonballus*. **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v.32, n.5, p.1387-1393, 2008.
- WANG, J.; LIA, J.; CAO, J.; JIANG, W. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and postharvest disease in fruits. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v.4, n.11, p.1100-1104, 2010.
- WILSON C. L.; WISNIEWSKI M. E., **Biological Control of Postharvest Diseases - Theory and Practice**. CRC Press, Boca Raton. 1994.
- YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.59, p.113-122, 2004.
- YAEESH, S.; JAMAL, Q.; KHAN, A. U.; GILANI, A.H. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. **Phytother Res**. v.20, n.7, p.546-51. 2006.
- ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on yacon, *Polymnia Sonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**. v.45, p.72-85, 1991.

# **ANEXO 1**

**Anexo 1. Características experimentais do método cromatográfico empregado neste trabalho.**

Composto	R	Faixa linear de trabalho (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Precisão RSD (%)	Exatidão (%)
1) GAL	0,9990	0,5 – 100,0	0,03	0,10	1,9	104,7
2) CAT	0,9997	2,5 – 100,0	0,06	0,19	3,5	83,8
3) CAF	0,9997	1,0 – 100,0	0,03	0,11	2,3	103,4
4) RUT	0,9996	0,5 – 100,0	0,05	0,16	2,8	88,2
5) FER	0,9997	1,0 – 100,0	0,04	0,12	1,6	97,6
6) QUER	0,9984	1,0 – 100,0	0,02	0,08	3,7	94,6
7) MIR	0,9976	2,5 – 100,0	0,03	0,09	4,2	91,8
8) FIS	0,9932	2,5 – 100,0	0,01	0,05	3,2	119,9
9) RES	0,9996	1,0 – 100,0	0,03	0,10	1,9	100,0
10) QUE	0,9997	0,5 – 100,0	0,04	0,14	1,6	94,0
11) CAN	0,9997	0,5 – 100,0	0,02	0,08	2,5	100,0
12) CRI	0,9995	0,5 – 100,0	0,05	0,16	3,1	93,0
13) FLA	0,9997	0,5 – 100,0	0,36	1,20	2,1	97,2

(Fonte: Lima, 2012)

\* 1-Ácido gálico, 2-Catequina, 3-Ácido cafeico, 4-Rutina, 5-Ácido ferúlico, 6-Quercetrina, 7-Miricetina, 8-Fisetina, 9-Resveratrol, 10-Quercetina, 11-Canferol, 12-Crisina, 13-Flavona); LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.