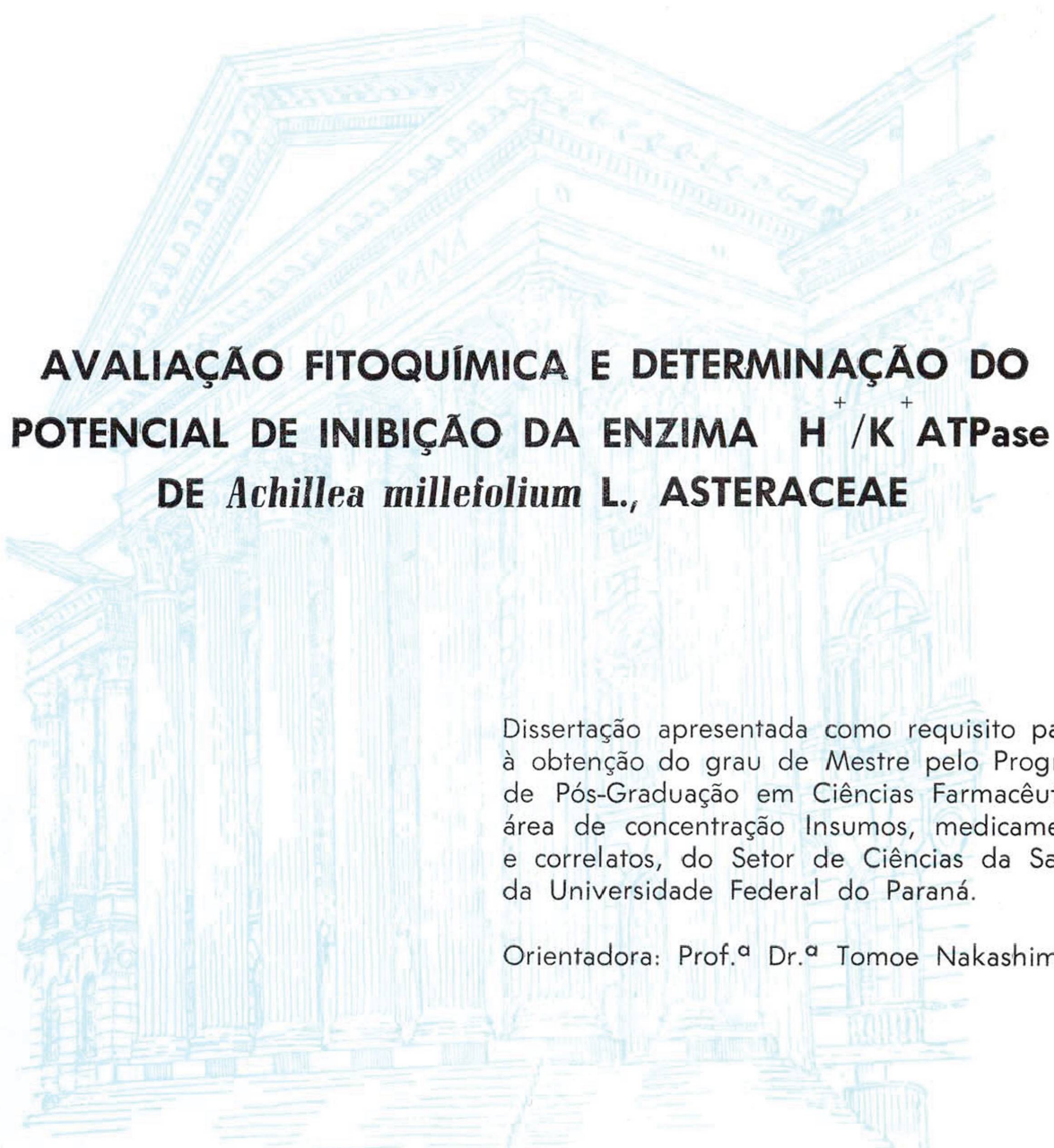


CHRISTIAN BOLLER



**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DO
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA H^+ / K^+ ATPase
DE *Achillea millefolium* L., ASTERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Tomoe Nakashima

CURITIBA
2005

CHRISTIAN BOLLER

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DO
POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA H^+ / K^+ ATPase
DE *Achillea millefolium* L., ASTERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
área de concentração Insumos, medicamentos
e correlatos, do Setor de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Tomoe Nakashima

CURITIBA
2005

Boller, Christian

Avaliação fitoquímica e determinação do potencial de inibição da enzima H⁺/K⁺ATPase de *Achillea millefolium* L., Asteraceae / Christian Boller. - Curitiba, 2005.

xiv, 54 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui Bibliografia.

1. Avaliação fitoquímica. 2. Óleo essencial. 3. H⁺/K⁺ATPase. 4. *Achillea millefolium*. 5. Aquiléia. I. Nakashima, Tomoe. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.


CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

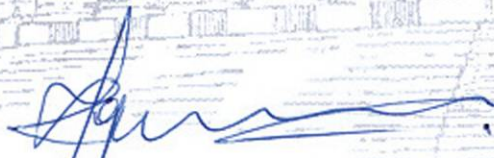
CHRISTIAN BOLLER

Título: "Avaliação fitoquímica e determinação do potencial de inibição da enzima H^+/K^+ ATPase de *Achillea millefolium* L., Asteraceae"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof^a. Dra. Tomoe Nakashima
Orientadora


Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Universidade Federal do Paraná


Prof^a. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de fevereiro de 2005

*Na vida é preciso ter
sonhos, coragem e fé*

The Journey of Man - Cirque du Soleil

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, Pai e Filho, por me conceder a vida e a oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço também aos meus pais, Eloy e Elfi, e minha irmã Shirley, pelo amor, carinho, educação e companheirismo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. [Nome], pela orientação, paciência e incentivo durante todo o processo.

Agradeço aos meus colegas de curso, especialmente [Nomes], pela amizade e apoio.

Agradeço ao [Instituição] e ao [Curso] por proporcionar esta oportunidade de aprendizado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Dedico este trabalho os meus pais, Eloy e Elfi e minha irmã Shirley pela vida, amor, carinho, educação e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade recebida para a realização deste trabalho.

Aos professores doutores Tomoe Nakashima, Ricardo Soccol e Maria Consuelo Andrade Marques, pela participação na Banca Examinadora e pelas valiosas sugestões.

A Prof. Dr^a Tomoe Nakashima, orientadora e amiga; palavras são poucas para expressar gratidão, pelos conselhos e “puxão de orelha”, desde a graduação e durante o mestrado.

Ao Departamento de Farmacologia da UFPR, em especial a Prof^a Dr^a Maria Consuelo Andrade Marques por ter permitido realizar os experimentos farmacológicos em seu laboratório.

À FAS por ter cedido o material, em especial à Farmacêutica Jorgeth A. Gonçalves.

À Elisa Perez e Joceline Franco pela amizade e horas de convívio; a Christhiane Cutrim, sempre dando força mesmo estando longe de Curitiba e aos colegas do laboratório de Farmacologia, Cristiane Baggio, Glaucia D. Otofui e Cristina Setim Freitas

Ao Prof. Possamai, Angelo e Thamy Possamai e Fabrício Brito pela amizade e apoio.

À Hilda Aparecida dos Santos, Maria das Graças T. Toledo, Maria Cristina S. Barbosa, pelas horas de descontração e conversa, durante o chá ou café da manhã.

Aos amigos de graduação que sempre me acompanharam durante todo esse tempo: Haiét Zaki, Renata C. dos Reis, Regiane L. Kawamura, Ana Maria S. Huppel, Sinajana Ribas, Gustavo Bertol, Luzia Franco, Rafaela M. Guarise, Alexandre K. Malinowski, Hudson G. Amstalden, Kahtleen Libânio.

As professoras Tânia M. B. Bonfim e Iara M. Machado, e aos alunos de graduação do Curso de Farmácia da UFPR, que me acompanharam durante o estágio em docência na disciplina de Enzimologia I do curso de Farmácia da UFPR.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial aos do Laboratório de Fitoquímica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE Dumortier, 1922.....	4
3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO/ESPÉCIE.....	6
3.2.1 Gênero <i>Achillea</i>	6
3.2.2 Espécie <i>Achillea millefolium</i> L., Asteraceae.....	7
3.2.2.1 Descrição botânica.....	8
3.2.2.2 Sinonímia.....	10
3.2.2.3 Usos.....	10
3.2.2.3 Composição química.....	11
3.2.2.4 Propriedades fármaco e toxicológicas.....	14
3.3 SISTEMA GASTRINTESTINAL.....	16
3.3.1 Estrutura do estômago.....	16
3.3.1.1 Mucosa gástrica.....	19
3.3.2 Secreção gástrica.....	21
3.3.2.1 Secreção de HCl.....	21
3.3.2.2 Substâncias que alteram a secreção de HCl.....	24
3.3.2.3 Úlcera péptica.....	25
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	27

4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	27
4.2.1 Extração do óleo essencial.....	28
4.2.2 Preparo do extrato aquoso a 20 %.....	28
4.2.2.1 Determinação de cor, odor, sabor, pH e teor de sólidos %.....	28
4.2.2.2 Pesquisa de heterosídeos antociânicos.....	28
4.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	29
4.2.2.4 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos.....	29
4.2.2.5 Pesquisa de taninos.....	29
4.2.2.6 Pesquisa de aminogrupos.....	30
4.2.2.7 Pesquisa de ácidos fixos e voláteis.....	30
4.2.3 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20 %.....	31
4.2.3.1 Determinação de cor, odor, sabor, pH e teor de sólidos %.....	31
4.2.3.2 Pesquisa de alcalóides.....	31
4.2.3.3 Pesquisa de leucoantocianidina.....	32
4.2.3.4 Pesquisa de heterosídeos flavônicos.....	32
4.2.3.4 Pesquisa de heterosídeos cumarínicos.....	32
4.2.3.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	33
4.2.3.6 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos.....	33
4.3 ATIVIDADE H^+/K^+ ATPase: PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	33
4.3.1 Obtenção dos extratos.....	33
4.3.2 Fracionamento do extrato.....	35
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA H^+/K^+ ATPase.....	36
4.5 DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 (CI_{50}).....	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.7 ESTUDO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	39
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA H^+/K^+ ATPase.....	40
5.2.1 Extratos EH90, EH70 e EH50.....	40
5.2.2 Efeito dos extratos EH90, EH70 e EH50, sobre a atividade da enzima H^+/K^+ ATPase.....	41

5.2.3 Fracionamento do extrato EH70.....	43
5.2.4 Efeito do resíduo e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica finais, sobre a atividade da enzima $H^+/K^+ATPase$	44
5.3 ESTUDO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA.....	48
6 CONCLUSÃO.....	49
REFÊRENCIAS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP cíclico: Adenosina Monofosfato cíclico

ATC: Ácido Tricloro Acético

ATP: Trifosfato de Adenosina

B.M.: Banho-maria

Ca⁺²: Íon Cálcio

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

Células ECL: Células Enterocromafins Simile

CG/MS: Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa

Cl⁻: Íon Cloro

Cl₅₀: Concentração Inibitória 50%

CO₂: Dióxido de Carbono

DL₅₀: Dose Letal 50%

EH50: Extrato Hidroalcoólico a 50% de etanol

EH70: Extrato Hidroalcoólico a 70% de etanol

EH90: Extrato Hidroalcoólico a 90% de etanol

FAS: Fundação de Ação Social

F.M.: Fase móvel

H⁺: Íon Hidrogênio

H⁺/K⁺ATPase: Bomba Hidrogênio/Potássio ATPase

H₂CO₃: Ácido Carbônico

H₂O: Água

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

HCl: Acido Clorídrico

HCO₃⁻: Bicarbonato

IP₃: Trifosfato de Inositol

K⁺: Íon Potásio

KCl: Cloreto de Potássio

N: Normal

NaOH: Hidróxido de Sódio

NH₄OH: Hidróxido de Amônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto da inflorescência de <i>A. millefolium</i> L., flor branca.....	9
Figura 2	Aspecto da inflorescência de <i>A. millefolium</i> L., flor violácea.....	9
Figura 3	Exemplo de lactona sesquiterpênica.....	12
Figura 4	Exemplo de componentes do óleo de <i>Achillea millefolium</i>	13
Figura 5	Flavonóides da <i>Achillea millefolium</i>	13
Figura 6	Outros compostos presentes na <i>Achillea millefolium</i> , L.....	14
Figura 7	Representação esquemática da parede do estômago.....	17
Figura 8	Organização interna do estômago.....	18
Figura 9	Organização da glândula gástrica.....	20
Figura 10	Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas de <i>Achillea millefolium</i>	34
Figura 11	Fluxograma de fracionamento do extrato hidroalcoólico 70 % das folhas de <i>Achillea millefolium</i>	36
Figura 12	Efeito do extrato EH90, EH70 e EH50 (50, 100, 500 e 1000 μ M/mL) na atividade da H^+/K^+ ATPase.....	42
Figura 13	Efeito do resíduo e das frações (50, 250, 500 e 700 μ M/mL) na atividade da H^+/K^+ ATPase.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Enquadramento taxonômico da <i>Achillea millefolium</i> L.....	8
Tabela 2	Resultados da análise fitoquímica preliminar.....	39
Tabela 3	Teor de sólidos, coloração e quantidade total de material extraído nos extratos de <i>Achillea millefolium</i>	40
Tabela 4	Coloração, teor de sólidos e quantidade total de material extraído, obtido no extrato EH70 de <i>Achillea millefolium</i> a partir de 1000 g de planta seca.....	43
Tabela 5	Coloração, teor de sólidos e quantidade total de material extraído, obtido nas frações do extrato EH70 de <i>Achillea millefolium</i> a partir de 1000 g de planta seca.....	44

RESUMO

A espécie *Achillea millefolium* L., é uma planta pertencente à família Asteraceae, originária da Europa e Ásia, tendo sido introduzida nas Américas e aclimatada no Brasil. A dificuldade em separar taxonomicamente as espécies do gênero, levaram a criação do grupo *Achillea millefolium*, onde as diferentes espécies apresentam semelhanças morfológicas, anatômicas e genéticas, sendo o número de cromossomos múltiplo de nove. Assim, ocorrem naturalmente, dois subtipos de *Achillea millefolium*, variando em sua composição genética, uma triplóide com 27 e outra hexaplóide com 54 cromossomos. Esta variação genética reflete-se diretamente na composição química do óleo essencial, que pode ser utilizado para distinguir os subtipos, pois o óleo essencial obtido por hidrodestilação da variedade triplóide é de coloração clara, enquanto a hexaplóide é de coloração azul escura devido à presença de azulenos. Popularmente é utilizada no tratamento de um grande número de doenças, das quais poucas estão cientificamente comprovadas. Estudos anteriores revelaram um efeito protetor do extrato aquoso de *Achillea millefolium* sobre a mucosa gástrica levando, entre outros efeitos a redução da atividade da enzima H⁺/K⁺ATPase. Os objetivos deste trabalho foram o estudo biodirigido quanto ao potencial de inibição da H⁺/K⁺ATPase frente a extratos hidroalcoólicos de *Achillea millefolium* L., e a avaliação do óleo essencial e abordagem fitoquímica quanto aos metabólitos secundários. A hidrodestilação do óleo essencial realizada em duas etapas, apresentou um óleo essencial de coloração azul escuro e forte odor característico, variando em concentração de 0,6 a 0,2 ml%. A análise do óleo por CG/MS, apresentou como componentes majoritários azuleno (10 %), 1,8-cineol (8,20 %) e cariofileno (8,0 %). A análise fitoquímica preliminar revelou a presença de esteróides e/ou triterpenos, taninos condensados e hidrolisáveis, flavonóides, ácidos fixos e aminogrupos. Com relação a atividade ATPásica, foram preparados três extratos hidroalcoólicos a 90 %, 70 % e 50 % em etanol, utilizando-se as partes aéreas isentas de inflorescência de *Achillea millefolium*. A atividade da enzima H⁺/K⁺ATPase foi testada na presença de cada extrato previamente seco e mantendo-se um grupo controle sem qualquer extrato. Dos extratos testados, o hidroalcoólico 70 % foi o mais ativo em reduzir a atividade da enzima, sendo escolhido para a continuação dos estudos. Após a realização de partição líquido/líquido com solventes de polaridade crescente, obteve-se 5 amostras diferentes, das quais a atividade enzimática diminuiu significativamente na presença da fração clorofórmica. A análise química dessa fração revelou ausência dos metabólitos anteriormente citados. Após a realização de hidrólise do material na presença de ácido sulfúrico, observou-se a presença de aminogrupos, sugerindo a presença de amidas na fração clorofórmica.

PALAVRAS-CHAVE: Avaliação fitoquímica, óleo essencial, H⁺/K⁺ATPase, *Achillea millefolium*

ABSTRACT

The specie *Achillea millefolium* L., is a plant that belongs to the family Asteraceae, native of Europe and Asia, having been introduced in America and acclimatized in Brazil. Difficulties to separate taxonomically the species of the genera, led to the creation of de *Achillea millefolium* group, where the different species present morphological, anatomic and genetic relationship, with number of chromosomes in multiple of nine. There are two subtypes of *Achillea millefolium*, varying in its genetic composition: one a triploid ($2n=27$) and other hexaploid ($2n=54$). This genetic variation is expressed in chemical composition of the essential oil, obtained by steam distillation, the first of light, and the second of dark blue coloration due to the presence of azulene. In folk medicine it is used to treat a large range of diseases, although just a small group of them are scientifically proved. Preview researches have shown the effect of aqueous extract of *Achillea millefolium* on the enzyme $H^+/K^+ATPase$ activity reduction. The aim of this work were the evaluation of the hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* an the $H^+/K^+ATPase$ activity. The extraction of the essential oil was accomplished in two stages, resulted in an essential oil of dark blue coloration and strong characteristic scent, varying concentration from 0,6 to 0,2 mL%. In analysis by CG/MS, it presented as majority components azulene (10 %), 1,8-cineol (8,20 %), caryophyllene (8,0 %). The preliminar phytochemical analysis revealed the presence of steroids and/or triterpenes, condensed and hydrolysable tannins, flavonoids fixed acids and aminogroups. In relation to the ATPasic activity, hydroalcoholic extracts were prepared at 90%, 70% and 50%, using aerial parts without inflorescence of *Achillea millefolium*. After previously dried and using a control group without extract, the hydroalcoholic extract at 70%, showed as more active and it was submitted liquid/liquid extration with solvents of growing polarity, from which 5 differentiated samples were obtained. All of them were tested against the enzyme and the chloroformic fraction showed the best activity. The chloroformic fraction did not show any of the previously metabolites. After hydrolysis with sulfuric acid, it was observed the presence of aminogroups, suggesting the presence of amide like compounds in this fraction.

KEY-WORDS: Phytochemical evaluation, essential oil, $H^+/K^+ATPase$, *Achillea millefolium*

1 INTRODUÇÃO

O homem primitivo, ao procurar plantas para seu sustento, foi descobrindo plantas com ação tóxica ou medicinal, tendo-se indícios de sua utilização nas mais antigas civilizações. Nesse campo entra a etnofarmacologia, que consiste em combinar as informações junto à população, quanto ao uso das plantas medicinais com estudos em laboratório, visando correlacionar as substâncias ativas presentes com a atividade farmacológica presente na espécie vegetal em estudo (SIMÕES *et al.*, 2000).

As plantas medicinais fazem parte da terapêutica em praticamente todos os países. Há poucos anos, os avanços no campo da medicina e inovações feitas pela indústria farmacêutica levaram a crer que o uso de fitoterápicos seria reduzido. Isto não se traduziu na realidade, quando se observa que em 1990, na comunidade européia, foi estimado em 2,4 bilhões de dólares o comércio de produtos fitoterápicos (NEWALL *et al.*, 2002)

Estudos envolvendo plantas medicinais oferecem dificuldades, devido à confusão botânica entre as espécies afins, a presença ou ausência de princípios ativos em determinado período do ano ou em plantas da mesma espécie plantadas em locais diferentes, difícil controle químico devido ao grande número de compostos presentes no vegetal. Entretanto, o avanço tecnológico em áreas como a química, biologia molecular e engenharia genética ainda não superou a natureza na formulação de moléculas com atividade terapêutica. Assim, as plantas medicinais representam, potencialmente, uma fonte alternativa no fornecimento de novas estrutura químicas, assim como um recurso ativo na forma de um fitoterápico padronizado e eficaz (CAVALCANTI, 2002).

A *Achillea millefolium* L., pertence a família Asteraceae, sendo originária da Europa e Ásia, introduzida nas Américas e aclimatada no Brasil. Esta espécie vegetal traz muitos problemas em relação a sua caracterização, pois existem grandes semelhanças morfológicas nas diferentes espécies do gênero (CHANDLER *et al.*, 1982), sendo relatado mudanças significativas na composição de metabólitos secundários (DENFFER, *et al.*, 1990).

Apesar desses problemas, muitos princípios ativos foram isolados com sucesso da *Achillea millefolium*, muitos dos quais já se têm dados sobre a atividade terapêutica (CHANDLER *et al.*, 1982).

Estudos anteriores demonstraram a ação farmacológica do extrato aquoso da planta frente a gastroproteção, onde foi observado uma diminuição da secreção ácida do estômago, o que favorece a recuperação de indivíduos que sofrem de problemas gástricos (BAGGIO, 2004).

Esse trabalho visa dar continuidade aos estudos da ação de extrato hidroalcoólico de *Achillea millefolium* sobre a enzima $H^+/K^+ATPase$, dirigindo o estudo para uma possível caracterização do grupo químico responsável pela atividade da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação fitoquímica e determinação do potencial de inibição da enzima H⁺/K⁺ATPase de *Achillea millefolium* L., Asteraceae

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliação fitoquímica preliminar quanto aos metabólitos secundários presentes na espécie;
- ✓ Extração e caracterização dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/MS).
- ✓ Avaliação da atividade da enzima H⁺/K⁺ATPase frente a diferentes extratos hidroalcoólicos preparados com as folhas de *Achillea millefolium*;
- ✓ Fracionamento do extrato mais ativo, seguido da avaliação da atividade H⁺/K⁺ATPase de cada fração.
- ✓ Estudo da fração ativa quanto à presença de metabólitos secundários.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA: ASTERACEAE Dumortier, 1922

Com duas sinonímias descritas em literatura, a família *Asteraceae* ou *Compositae* engloba cerca de 1.500 gêneros (dos quais, aproximadamente 180 encontram-se no Brasil), nos quais se distribuem aproximadamente 23.000 espécies. Diferenças morfológicas e moleculares fizeram necessária a distribuição das espécies em aproximadamente 17 tribos agrupadas em 3 subfamílias. Estes fatores fazem desta família um dos maiores grupos sistemáticos das angiospermas (CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1991 citado por HEEMANN, 2002; JUDD *et al.*, 1999).

O elevado número de espécies reflete-se também na distribuição geográfica das mesmas. Estas se distribuem por todos os continentes, entretanto, são mais facilmente encontradas em regiões de clima temperado, subtropical não densamente florestado e tropical montanhoso, dentre estes, especialmente regiões áridas e de campo aberto (CRONQUIST, 1981; JUDD *et al.*, 1999).

Os diferentes organismos apresentam um desenvolvimento evolutivo muito ativo, pois, além de possuírem os mais variados métodos de polinização e propagação das sementes (vento, insetos, mamíferos e aves), apresentam também um elevado percentual de modificações genéticas, tais como, hibridização, poliploidia e agamospermia. Isto, acaba contribuindo sobremaneira na propagação e no número de espécies (DENFFER *et al.*, 1990; JUDD *et al.*, 1999).

São plantas de hábito muito variado, sendo cerca de 98 % de pequeno porte. Destacam-se ervas, subarbustos, trepadeiras e excepcionalmente árvores de baixo a médio porte (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998).

Morfologicamente apresentam, externamente, diversos tricomas. As **folhas** são alternadas, opostas ou raramente verticiladas; simples sendo as vezes altamente lobada, dissecta ou composta; inteiras ou dentadas com venação pinada ou digitada; estomatos anomocíticos ou ocasionalmente anisocíticos; ausência de estípulas. As **inflorescências** podem apresentar de um a vários capítulos em posição terminal ou axilar, sendo estes característicos dessa família; os capítulos podem apresentar de poucas a numerosas flores sésseis sustentadas pelo mesmo

receptáculo, os capítulos florais apresentam também uma série de brácteas involucrais (filárias). As **flores** são pentâmeras, com cálice profundamente modificado, transformado no papilho, servindo à disseminação do fruto, sendo este piloso ou espinhoso. Corola pentâmera com 5 lobos iguais ou então, ligulada ou bilabiada; androceu formado por 5 estames férteis com filetes livres e anteras introrsas, soldadas em um tubo que é atravessado pelo estilete; ovário sempre ínfero, bicarpelar, unilocular, com um só óvulo ereto. Estilete freqüentemente com um anel de pêlos logo abaixo da bifurcação; presença de nectários no topo do ovário. **Fruto** seco indeiscente, tipo aquênio, disperso pelo vento ou excepcionalmente ficando encerrado no capítulo que então tem brácteas duras e espinhosas. Os **capítulos** podem conter somente flores tubulosas iguais, flores liguladas nos bordos e tubulosas no centro ou somente flores liguladas; estes podem ainda conter somente flores hermafroditas, flores femininas nos bordos e hermafroditas no centro, femininas nos bordos e masculinas no centro ou flores masculinas e femininas em plantas separadas (dióicas). Além das brácteas, em algumas espécies ocorre a presença de bractéolas em cada flor individual (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998; JUDD *et al.*, 1999).

As inflorescências desta família, destacam-se pela exuberância dos capítulos, variando grandemente em tamanho e coloração, sendo por essa razão muito utilizadas como plantas ornamentais, tem-se como exemplo, as espécies de *Dahlia* (dália), *Chrysanthemum* (margarida ou rainha-margarina), *Zinnia* (jacinto), *Tagetes* (tagete) entre outras. Já outras espécies são muito utilizadas como alimento, onde se utilizam, além das flores, outras partes do vegetal como o óleo extraído das sementes de girassol (*Helianthus*); as folhas de alface (*Lactuca*), chicória, endívia, almeirão e escarola (*Chicorium* sp.); receptáculo floral e brácteas externas do capítulo da alcachofra (*Cynara*); raízes de bardana (*Arctium*) (JOLY, 1998).

Com relação a caracteres internos, esta família é conhecida por acumular carboidratos na forma de oligossacarídeos, especialmente inulina. Ocorre a presença de canais resiníferos ou laticíferos, onde, nos primeiros, são produzidos compostos poliacetilênicos, sendo estes alifáticos, cíclicos, aromáticos ou heterocíclicos e no segundo grupo látex rico em compostos triterpênicos. Outro grupo de metabólitos presente na família Asteraceae são os óleos essenciais,

destacando-se os de origem terpenóide (principalmente as lactonas sesquiterpênicas). Em algumas tribos ocorre a presença de alcalóides (principalmente pirrolizidínicos), também chamados de alcalóides do *Senecio*. Ocasionalmente algumas espécies apresentam, ainda, glicosídeos cianogênicos (derivados da fenilalanina ou valina). Entretanto, essa família não apresenta como característica a presença de compostos iridóides ou taníferos (ou são fracamente taníferos), geralmente ocorrendo falta de ácido elágico e protoantocianidinas. Cristais de cálcio são raros nesta família (CRONQUIST, 1981; JUDD *et al.*, 1999).

Devido à variedade de metabólitos secundários produzidos pelos membros da família Asteraceae, é grande a quantidade de plantas medicinais presentes nessa família, bem como outras espécies não medicinais, com importância econômica e social. Tem-se como exemplos *Stevia rebaudiana* (steviosídeo – oligossacarídeo) *Taraxacum officinale* (dente de leão – inulina); *Mikania* spp. (guaco – cumarinas); *Chamomilla recutita*, *Baccharis* spp. (camomila e carqueja, respectivamente – óleos essenciais), *Chrysanthemum* spp. (compostos piretróides, inseticidas - crisântemos), entre outras espécies (DENFFER *et al.*, 1990; JOLY, 1998; SIMÕES *et al.*, 2000).

3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO/ESPÉCIE

3.2.1 Gênero *Achillea*

O gênero *Achillea* compreende diversas espécies de difícil separação, devido a semelhança em seus caracteres morfológicos (CHANDLER *et al.*, 1982). Nas espécies de *Achillea* interrelacionadas, é comum o fenômeno de polimorfismo bioquímico (em relação aos óleos essenciais) e citogenético (em relação ao número de cromossomos), ou mesmo a formação de raças ecológicas dentro da mesma espécie, quando cultivada em diferentes localidades (PLCHOVÁ *et al.*, 1975; EVANS, 1989; DENFFER *et al.*, 1990).

Segundo o Missouri Botanical Garden (MBG:W3TROPICOS, 2005), o primeiro relato de descrição do gênero foi feito por Linnaeus em 1753. Nesta época ele descreveu a espécie *Achillea santolina*, e desde então foram catalogados pouco mais de 250 registros sobre espécies do gênero, muitos dos quais são sinônimos.

3.2.2 Espécie *Achillea millefolium* L, Asteraceae

A *Achillea millefolium* é considerada como sendo a espécie mais conhecida do gênero *Achillea* (CHANDLER *et al.*, 1982), sendo originária da Europa e Ásia e introduzida nas Américas, tendo sido aclimatada e muito comum no Brasil (BALBACHAS, 1960; PIO CORREIA, 1969).

Seu nome está historicamente associado ao herói grego Achilles, o qual dizem ter utilizado folhas da planta para estancar a hemorragia dos seus companheiros. O nome da espécie advém do aspecto de suas folhas, as quais se parecem tão finamente divididas, passando a impressão de haverem milhares (CHANDLER *et al.*, 1982).

Devido à dificuldade de separar taxonomicamente as espécies de *Achillea*, a espécie *Achillea millefolium* e outras relacionadas foram separadas e enquadradas em grupos. O grupo ao qual pertence a espécie em estudo é denominado complexo ou grupo *Achillea millefolium*. As espécies foram agrupadas desta maneira devido à semelhanças morfológicas, anatômicas e genéticas, uma vez que as espécies deste grupo possuem um número de cromossomos igual a nove, sendo esse multiplicado por um número inteiro, pois as espécies sofrem de poliploidia (PLCHOVÁ *et al.*, 1975).

Segundo KUBELKA *et al.* (1999), estão agrupados neste grupo, 12 espécies bem definidas, nas quais são citadas nove, e incluem *A. setacea* (diplóide, $2n=18$), *A. aspleniifolia* (diploide, $2n=18$), *A. roseoalba* (diplóide, $2n=18$), *A. collina* (tetraplóide, $2n=36$), *A. ceretanica* (tetraplóide, $2n=36$), *A. pratensis* (tetraplóide, $2n=36$), *A. distans* (tetraplóide, $2n=36$), *A. millefolium* (hexaplóide, $2n=54$), *A. pannonica* ($2n=72$). As outras três espécies relacionadas a este grupo são *A. cuspidata* (diplóide, $2n=18$), *A. borealis* (hexaplóide, $2n=54$) e *A. asiática* (diplóide, $2n=18$) (VALANT-VETSCHERA e WOLLENWEBER, 1988).

Entretanto, apesar de bem estabelecido a condição hexaplóide da *Achillea millefolium*, PLCHOVÁ *et al.* (1975), cita a existência de *Achillea millefolium* triplóide ($2n=27$). Destaca-se que estas variedades se diferenciam pela coloração do óleo essencial obtido, tendo a primeira um óleo essencial de coloração azul (devido a presença de azuleno) e a segundo um óleo de coloração clara (devido a ausência de azuleno).

Segundo CRONQUIST (1981) a espécie possui o seguinte enquadramento taxonômico:

Tabela 1: Enquadramento taxonômico da *Achillea millefolium* L. (CRONQUIST, 1981; JUDD *et al.*, 1999)

Taxon	Classificação
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Asteridae
ORDEM	Asterales
FAMÍLIA	Asteraceae
SUBFAMÍLIA	Asteroideae
TRIBO	Anthemideae
GÊNERO	<i>Achillea</i>
ESPÉCIE	<i>Achillea millefolium</i> Linnaeus

3.2.2.1 Descrição botânica

Caracteriza-se por ser uma erva perene, rizomatoza e estolonífera, glabra ou pouco lanuginosa, com caules eretos, ramosos na parte superior, alcançando 20 – 60 cm de altura. Possui folhas alternas, do tipo oblongo-lanceoladas, profundamente bi ou tripinatissectas, com segmentos lineares, de 60 – 100 mm de comprimento total e 20 – 40 mm de largura e coloração verde-acinzentado com odor aromático característico. As sumidades floridas distribuem-se em capítulos densamente corimbosos, de 5 mm de altura por 3 mm de diâmetro, com brácteas brancas marginais (Figura 1), podendo variar de róseo a vermelho (Figura 2). As flores marginais liguladas, femininas e brancas, e as do disco são hermafroditas e amarelas. Os aquênios são compridos, oblongos, glabros, de 1,5 – 2 mm de comprimento, desprovidos de pappus (PIO CORREIA, 1969; CHANDLER *et al.*, 1982). É cultivada na região de Curitiba, onde floresce de outubro a março (OLIVEIRA, 1999) e no hemisfério norte de maio a junho (BALBACHAS, 1960).



Figura 1: Aspecto da inflorescência de *A. millefolium* L., flor branca.
(Foto: NAKASHIMA, 2002).



Figura 2: Aspecto da inflorescência de *A. millefolium* L., flor violácea.
(Foto: NAKASHIMA, 2002).

3.2.2.2 Sinonímia

Sinonímia popular e científica da espécie segundo referências encontradas.

Popular

Herba de carpinteiro, aquiléia, milefólio, mil-em-rama, mil-folhas, mil-folhada, erva-de-carpinteiro, pronto-alívio, anador (Brasil); colchón de pobre (Colombia); herva das cortadelas, herva dos carpinteiros, herva dos militares, mil-folhadas, mil folhas (Portugal); milenrama, melefólio, Yerba de los carpinteiros (Argentina); Millefeuille (França); Milfoil (Inglaterra); Millefoglio (Itália); Scharfgarbe (Alemanha); Tysiacheustnik (Rússia); Civanperçemi (Turquia); Yarrow (Países de língua inglesa) (BALBACHAS, 1960; PIO CORREIA, 1969; OLIVEIRA, 1999; CANDAN *et al.*, 2003).

Científica

Chamaemelum millefolium (L.) E. H. L. Krause; *Achillea borealis* subsp *arenicola* (Pollard) D. D. Keck; *Achillea borealis* subsp *californica* (Pollard) D. D. Keck; *Achillea lanulosa* Nutt.; *Achillea lanulosa* subsp *alpicola* (Rydb.) D. D. Keck; *Achillea laxiflora* Pollard & Cockerell; *Achillea millefolium* var. *alpicola* (Rydb.) Garret; *Achillea millefolium* var. *arenicola* (A. Heller) Nobs; *Achillea millefolium* var. *californica* (Pollard) Jeps., *Achillea millefolium* var. *gigantea* (Pollard) Nobs; *Achillea millefolium* var. *lanulosa* (Nutt.) Piper; *Achillea millefolium* var. *litoralis* Ehrend. ex Nobs, *Achillea millefolium* var. *pacifica* (Rydb.) G. N. Jones, *Achillea millefolium* var. *puberula* (Rydb) Nobs (MBG:W3TROPICOS, 2005)

3.2.2.3 Usos

O uso da *Achillea millefolium* é antigo, sendo relatado o uso pelo herói grego Aquilles durante a guerra de Tróia, sendo citado também, por Discórides (CHANDLER *et al.*, 1982).

Foi extensamente utilizada durante a guerra civil americana onde era aplicada a feridas para combater sangramento, daí, o nome popular “soldier’s woundwort”. Também, utilizada para conter sangramentos no nariz (CHANDLER *et al.*, 1982).

Índios norte-americanos indicavam o uso de *A. millefolium* na forma de chás, loções ou unguentos para tratar feridas, contusões e alívio de raches cutâneos, bem como, febrífugo e para resfriados comuns (CHANDLER *et al.*, 1982).

Outros usos populares incluem tratamento de epilepsia, hemorragias, hipertensão (KAKKALOU *et al.*, 1992); atividade espasmolítica e antiflogística (FISCHER *et al.*, 2001); analgésico, queimaduras, dores de ouvido e cabeça, hemorragias, hemorróidas, indigestão, entre outros (CHANDLER *et al.*, 1982); colagogo, dores menstruais e usado homeopaticamente para tratar varicoses, sangramentos arteriais e convulsões (PDR, 2000); antiinflamatório, antiséptico, cicatrizante (OLIVEIRA, 1999). No entanto, estes usos carecem, em sua grande maioria, de comprovação científica e de estudos clínicos

A *Achillea millefolium* está citada nas Farmacopéias Britânica, Austríaca, Francesa, Tcheca, Húngara, e Suíça (NEWALL *et al.*, 2002). Sua utilização é usualmente prescrita na forma de infusos preparados com 4,5 g de erva ou 5 g de flores em 500 mL de água fervente, que deve ser tomado na dose de 1 xícara três vezes ao dia. A prescrição homeopática prevê a sua utilização na forma de gotas, tabletes e glóbulos (OLIVEIRA, 1999; PDR, 2000).

3.2.2.3 Composição química

A destilação de um óleo essencial de coloração azul por Hoffmam em 1719, marca o início dos estudos da *Achillea millefolium* (CHANDLER *et al.*, 1982). Além desse, PLCHOVÁ *et al.* (1975), descreve a existência de um tipo de *A. millefolium* de onde extrai-se um óleo essencial de coloração clara. Esse autor, destaca que a coloração azul do óleo é devido a presença de azulenos, sendo esta observada apenas na variedade hexaplóide, enquanto que a variedade triplóide apresenta óleo livre de azuleno.

BAHN-NHU *et al.* (1979), isolaram pela primeira vez a achilicina (Figura 3) identificada quimicamente como 8 - acetoxiartabsina. Este composto é um proazuleno (lactona sesquiterpênica), que quando submetido ao aquecimento é capaz de formar azuleno que dá a coloração azul ao óleo. Outros derivados da artabsina e 3-oxa-artabsina, foram isolados por SCHRÖDER *et al.* (1994), sendo denominados de 8α -angeloxy-, 8α -tigloxy e 8α -acetoxo-10-epi-artasina (achillicina),

bem como, seus análogos 3-oxa derivados e anteriormente a esse grupo, ULUBULEN *et al.* (1990), isolaram a achillifolina e, é citado neste trabalho a existência de outras lactonas sesquiterpênicas como achillina, millefolina.

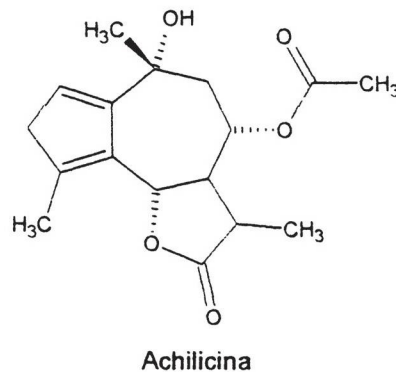


Figura 3: Exemplo de lactona sesquiterpênica (BAHN-NHU *et al.*, 1978)

Outros compostos, associados ao óleo essencial de *Achillea millefolium* derivados de sesquiterpenos são os guaianolídeos, eudesmanolídeos e longipinenonas (OCHIR *et al.*, 1991; KUBELKA *et al.*, 1999).

Dentre outros componentes do óleo essencial (Figura 4), destacam-se a presença de camazuleno, β -pineno, 1,8 – cineol, cânfora, borneol, β -cariofileno, germacreno, sabineno (KOKKALOU *et al.*, 1992). Entretanto, MOCKUTE e JUDZENTIENE (2003), destacam separação das plantas em quimiotipos, uma vez que ocorre uma variação considerável na composição do óleo em plantas de localidades diferentes.

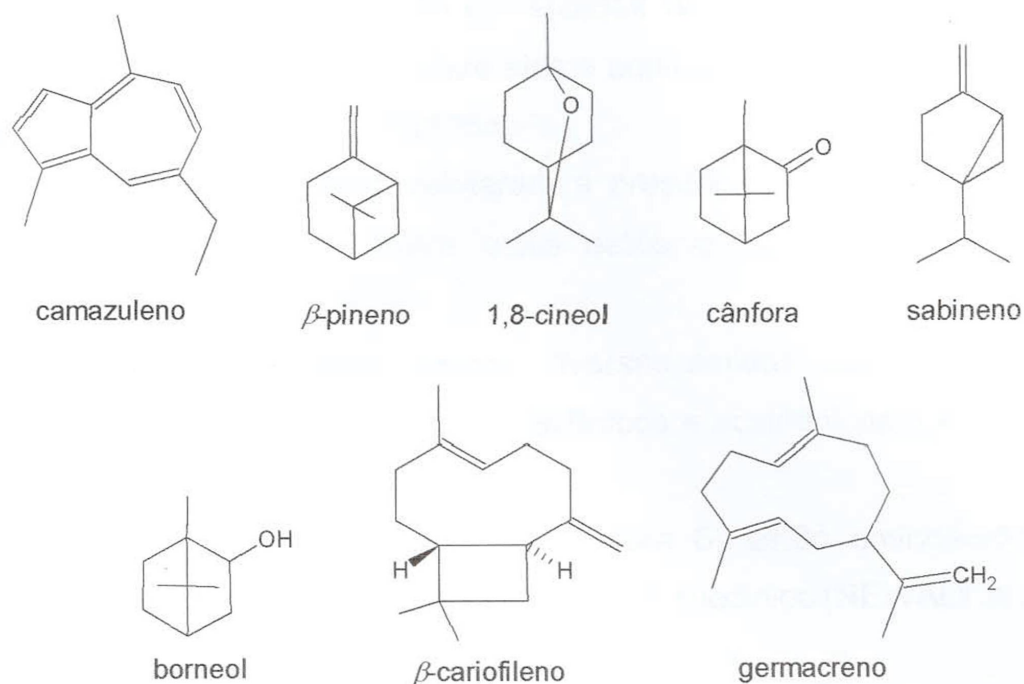
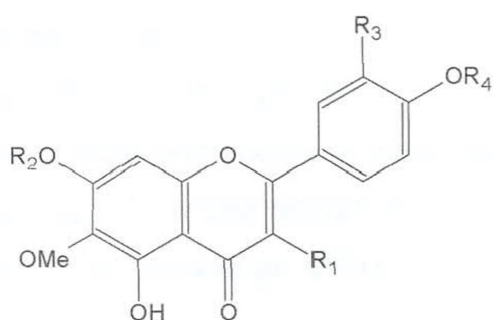


Figura 4: Exemplos dos componentes do óleo presentes na *Achillea millefolium*

Outro grupo de compostos presentes na espécie são os flavonóides (Figura 5). Foram descritas a presença de apigenina 7-O-glucosídeo (cosmosiina), luteolina 7-O-glucosídeo (cinarosídeo); rutina, quercetina, kaempferol e derivados metoxilados como a isorhamnetina, acacetina, artemetina, casticina e 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona. Destes, GUEDÓN *et al.* (1993), indicaram apenas a luteolina e a apigenina como corretos, uma vez que, como citado por CHANDLER *et al.* (1982), estudos antigos da *Achillea millefolium*, parecem não terem distinguido corretamente as espécies levando a equívocos. Além destes, a partir de um estudo com diversas espécies do grupo *Achillea millefolium*, VALANT-VETSCHERA e WOLLENWEBER (1988), encontraram pectolarigenina, 3-metilbetuletol e centaureidina.



Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Pectolarigenina	H	H	H	Me
3-Metilbetuletol	OMe	H	H	Me
Centaureidina	OMe	H	OH	Me

Figura 5: Flavonóides da *Achillea millefolium*

Vários compostos básicos foram isolados da espécie (CHANDLER *et al.*, 1982; MEHLFÜHRER *et al.*, 1997) entre eles a aquileína, um alcalóide presente nas folhas da planta MILLER e CHOW (1954).

CHANDLER *et al.* (1982), relataram a presença de esteróis, triterpenos e saponinas na *A. millefolium*. Entre estes estão o β -sistosterol, estigmasterol, campesterol e o colesterol

Foram encontrados nesta espécie diversas amidas piperideídicas sendo a porção ácida formada por ácidos graxos olefínicos e acetilênicos (GREGER, 1984; GREGER e HOFER, 1989)

Entre outros compostos presentes (Figura 6) estão aminoácidos; ácidos graxos; ácidos ascórbico, caféico, fólico, salicílico e succínico (NEWALL *et al.*, 2002).

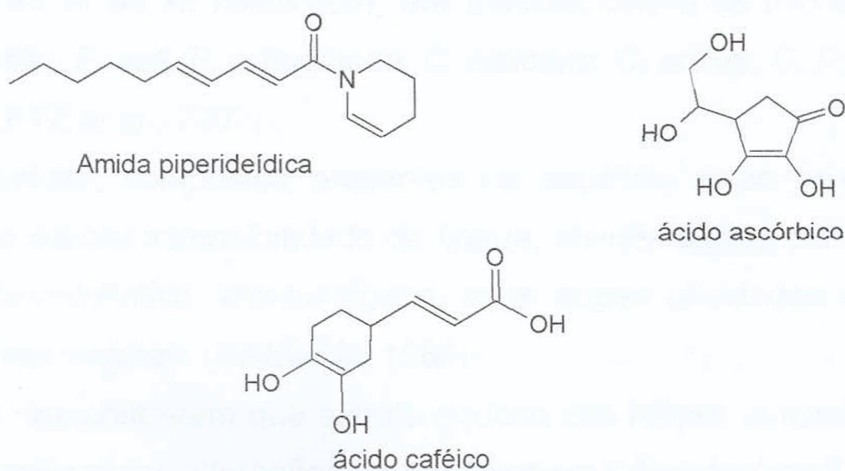


Figura 6: Outros compostos presentes na *Achillea millefolium*

3.2.2.4 Propriedades farmacológicas e toxicológicas

A *A. millefolium* é considerada uma planta de baixa toxicidade, porém existem, relatos de pessoas sensíveis que desenvolveram respostas alérgicas à planta, desenvolvendo dermatite de contato. Desta forma, a *Achillea millefolium* é considerada uma planta capaz de provocar uma leve a moderada sensibilização, sendo contra-indicada nesses casos. O uso da planta também é desaconselhada durante a gravidez devido ao seu potencial abortivo (CHANDLER *et al.*, 1982; PDR, 2000; PAUSEN *et al.*, 2001).

A presença de guaianolídeos e germacranolídeos leva a um efeito colagogo (estimula a secreção de bile). Os flavonóides estão ligados a atividade espasmolítica, enquanto que os proazulenos estão ligados a atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória (PDR, 2000).

Segundo CANDAN *et al.* (2003), o óleo essencial de *A. millefolium* possui alta atividade antioxidante, ao passo que o extrato metanólico praticamente não apresenta essa atividade. Esses mesmos autores destacam que o óleo essencial possui uma atividade antimicrobiana maior que o extrato metanólico, sendo a atividade moderada frente aos microorganismos *S. pneumoniae*, *C. perfringens* e *C. albicans* e uma baixa atividade frente aos outros microorganismos testados.

Outros testes de atividade antimicrobiana, demonstraram que o extrato hidroalcoólico 90 % de *A. millefolium*, era ineficaz contra os microorganismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. crusei*, *C. Parapsilosis* e *C. tropicalis* (HOLETZ *et al.*, 2002)

As alcanidas, compostos presentes na espécie, estão relacionadas com formigamento e parcial insensibilidade da língua, atividade inseticida, estomáquico, analgésico, anti-helmíntico, anti-tussígeno, entre outras atividades observadas em diversas espécies vegetais (GREGER, 1984).

Estudos demonstraram que extrato aquoso das folhas, utilizadas por via oral não levam a significativas alterações reprodutivas em ratos machos (DALSENTER *et al.*, 2004), entretanto, o extrato hidroalcoólico das flores aplicado por via intraperitoneal levou a uma pequena alteração nas funções reprodutivas de ratos machos (MONTANARI *et al.*, 1998).

Em 2002, CAVALCANTI, determinou que a dose letal 50 (DL₅₀) de extrato aquoso de folhas de *A. millefolium*, aplicado via oral, era maior que 6,5 g/kg e que ratos tratados em caráter agudo, subcrônico e crônico, não apresentaram comprometimento hematológico, nem das funções hepática, renal ou pancreática dos animais tratados o com extrato, não indicando toxicidade em doses até 1200 mg/kg (via oral - vo).

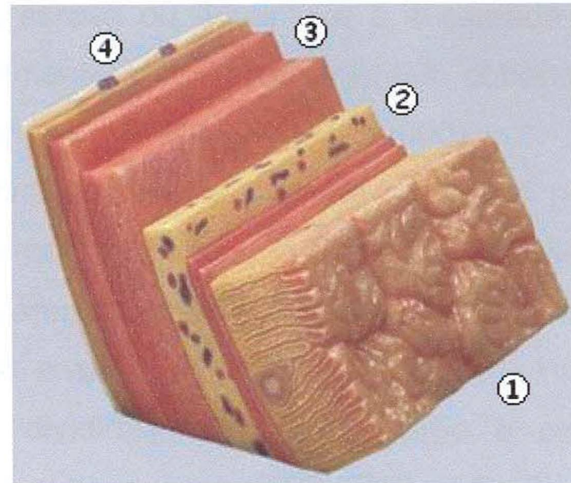
3.3 SISTEMA GASTRINTESTINAL

O sistema gastrointestinal compreende uma extensa e complexa rede de órgãos e tecidos, que, dispostos de forma ordenada, tem como funções principais digerir as substâncias alimentares e absorver as moléculas de nutrientes para a corrente sanguínea. Essas funções são realizadas por meio de quatro mecanismos principais, sendo esses: motilidade (movimentos que misturam e movimentam o conteúdo gastrointestinal), secreção (processos pelos quais as glândulas associadas ao tubo gastrointestinal lançam água e substâncias para dentro do tubo), digestão (processos pelos quais os alimentos e grandes moléculas são degradados quimicamente, para produzir moléculas menores, que podem ser absorvidas através da parede do tubo gastrointestinal) e absorção (processos pelos quais as moléculas são absorvidas pelas células que revestem o tubo gastrointestinal e penetram a corrente sangüínea) (BERNE e LEVY, 2000).

3.3.1 Estrutura do estômago

Dos órgãos associados ao sistema digestório, o estômago funciona como reservatório, permitindo a ingestão de grandes quantidades de alimento. Neste espaço é criado um ambiente próprio para promover a digestão, principalmente, de proteínas e lipídeos, bem como servir de barreira à entrada de microorganismos (BERNE e LEVY, 2000).

Ele está estruturado em forma de camadas que se superpõe. De acordo com a figura 7, pode-se observar quatro camadas distintas: a mucosa, a submucosa, a muscular externa e a serosa ou adventícia. Esta distribuição se repete ao longo de todo tubo gastrointestinal, sofrendo ligeiras alterações principalmente na camada mucosa, onde, para cada região, existe um conjunto de células especializadas (BERNE e LEVY, 2000).



1. Mucosa
2. Submucosa
3. Muscular Externa
4. Serosa

Figura 7: Representação esquemática da parede do estômago (MODELI ANATOMICI, 2005)

A mucosa é a camada mais interna do estômago, consiste em epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa. O epitélio é uma camada de células especializadas, que reveste a luz do estômago, e tem a função de proteger o tecido, bem como a secreção de diversas substâncias. A lâmina própria consiste, essencialmente, de tecido conjuntivo frouxo contendo fibrilas de colágeno e elastina, sendo uma camada rica em vários tipos de glândulas, abrigando também gânglios linfáticos e capilares sangüíneos. A muscular da mucosa é uma camada fina de músculo liso, que ao se contrair, altera a forma e a área superficial da camada das células epiteliais (COSTANZO, 1999; BERNE e LEVY, 2000).

A camada submucosa é composta essencialmente de tecido conjuntivo frouxo com fibrilas de colágeno e elastina, é nesta camada que se localizam os vasos sangüíneos mais calibrosos (BERNE e LEVY, 2000).

A próxima camada, a muscular externa, é formada por duas camadas musculares, o músculo circular e o músculo longitudinal e são responsáveis pela motilidade do estômago. Nessa região localiza-se a porção intrínseca do sistema nervoso autonômico (sistema nervoso entérico), formado pelo plexo submucoso (entre submucosa e o músculo circular) e o plexo mioentérico (entre as duas camadas de músculo). Estes se ligam a porção extrínseca do sistema nervoso autonômico que regula as funções digestivas (COSTANZO, 1999)

A camada serosa ou adventícia é a camada mais externa do estômago e consiste principalmente em tecido conjuntivo coberto por uma camada de células mesoteliais escamosas (BERNE e LEVY, 2000).

Além da divisão por camadas, o estômago pode ser dividido, também, de acordo com sua organização interna (Figura 8), recebendo diferentes denominações de acordo com a área de estudo. Assim, anatomicamente, subdivide-se o estômago em fundo, corpo e antro (COSTANZO, 1999). Histologicamente, as áreas do estômago estão divididas em cárdia, corpo e piloro, devido a variações na organização tecidual da mucosa (STEVENS e LOWE, 1995), e fisiologicamente, está dividido em região glandular cárdica, glandular oxíntica, e glandular pilórica, de acordo com a predominância dos tipos celulares (BERNE e LEVY, 2000). Pode-se observar, no entanto, que as divisões fisiológica e histológica variam apenas em nomenclatura, pois estão diretamente relacionadas.

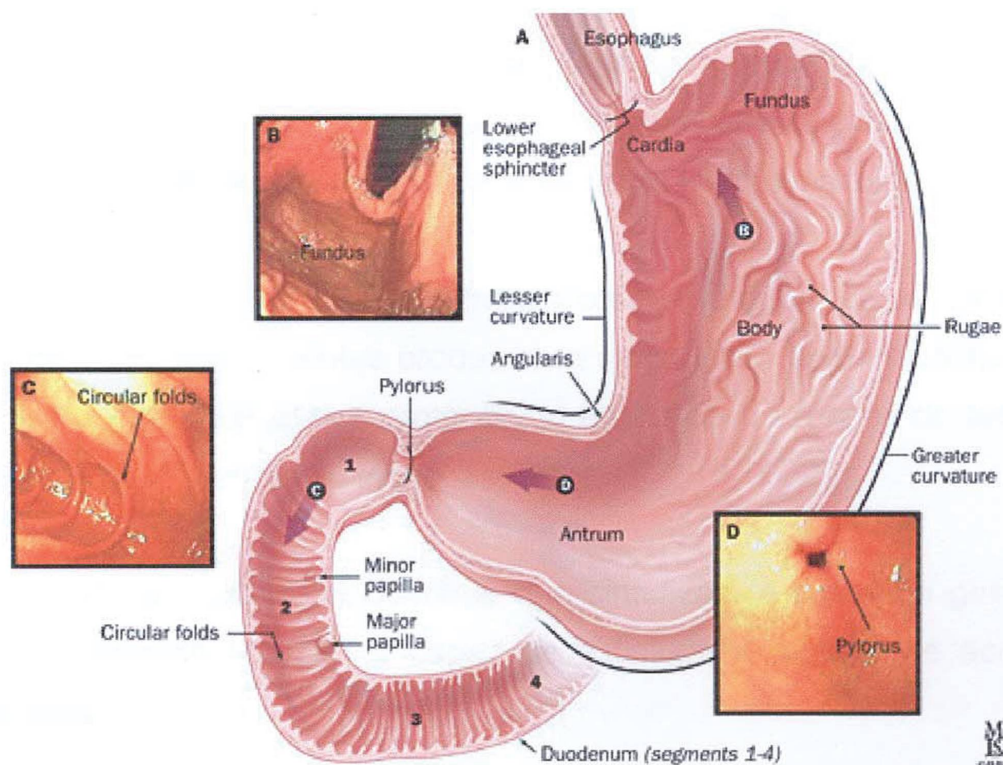


Figura 8: Organização interna do estômago (JONHS HOPKINS, 2005)

3.3.1.1 Mucosa gástrica (STEVENS e LOWE, 1995; COSTANZO, 1999; BERNE e LEVY, 2000)

O epitélio da mucosa gástrica é formado por diversos tipos celulares responsáveis, cada qual com sua respectiva função (Figura 9):

Células produtoras de ácido ou parietais: são células grandes com aspecto piramidal devido a compressão entre as células adjacentes. A superfície luminal é mais estreita que a basal, entretanto a sua área superficial é aumentada devido a presença de invaginações. Estas células possuem anidrase carbônica em grande quantidade, uma enzima que desempenha papel importante na geração de H^+ . Além de ácido, esta célula produz o fator antianêmico intrínseco, uma glicoproteína que torna possível a absorção da vitamina B_{12} pelo trato digestivo.

Células produtoras de enzima, principais ou pépticas: são células responsáveis pela produção de pepsinogênio, uma enzima que é convertida em sua forma ativa pelo ácido gástrico, a pepsina. Esta é responsável pela fragmentação de moléculas protéicas em pequenos peptídeos de baixo peso molecular.

Células mucosas: são células epiteliais colunares que revestem a superfície da mucosa gástrica. Estas células produzem o muco e um fluido alcalino formado por bicarbonato, essencial para a proteção do tecido contra a ação do ácido e das enzimas digestivas presentes no meio gástrico.

Células G: são células endócrinas que sintetizam e secretam gastrina, um hormônio, que quando liberado é capaz de estimular a síntese de ácido pelas células parietais.

Células D: outro conjunto de células endócrinas que sintetizam e liberam somatostatina, peptídeo capaz de promover a inibição da produção de ácido

Células ECL ou enterocromafins-símile: células presentes na mucosa gástrica que sintetizam e liberam histamina.

Células precursoras: são células pequenas e não especializadas, capazes de originar todas as células do epitélio gástrico.

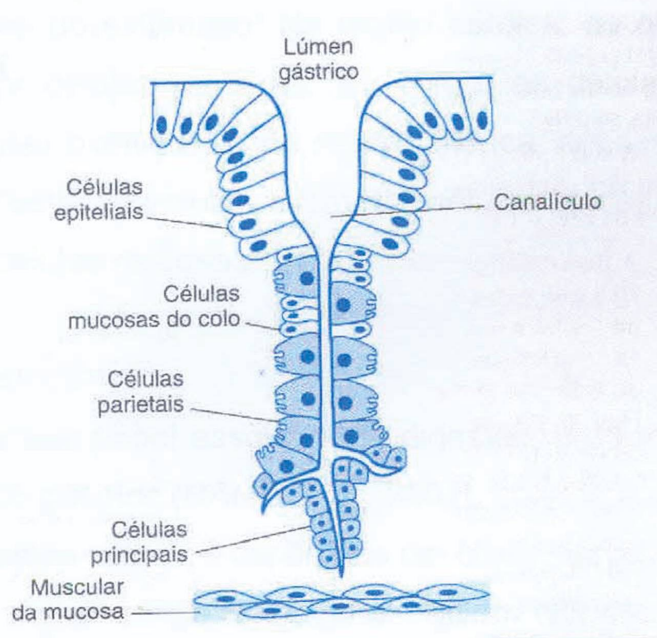


Figura 9: Organização da glândula gástrica (COSTANZO, 1999)

O epitélio gástrico apresenta em toda sua extensão depressões que terminam em glândulas secretoras, que, dependendo da região do estômago, diferentes células estão presentes. Assim, a mucosa está dividida histologicamente em três zonas:

Zona superficial: composta por uma camada de células mucosas superficiais que formam as depressões, também chamadas de fovéolas, fossetas ou criptas. Essa região é aproximadamente constante quanto a sua estrutura ao longo de todo o estômago.

Zona do colo: liga a zona superficial à zona profunda, formada essencialmente por células precursoras imatura que se proliferam e migram para as

regiões acima e abaixo dela, repondo os tipos celulares destes locais. Também permanece constante por toda mucosa.

Zona profunda: é composta por glândulas cuja base está próxima ou em contato com a muscular da mucosa. Esta região é bastante variável com relação aos tipos celulares presentes, e é, com base nessa composição celular, que são divididas as regiões do estômago. Na região cárdica, as glândulas são formadas essencialmente por células mucosas; no corpo, as células parietais e pépticas compõem as glândulas oxínticas; e na região pilórica, células G formam a glândula pilórica. Em todas estas glândulas, além das células típicas de cada região, se faz presente também células mucosas.

3.3.2 Secreção gástrica

O estômago tem papel essencial na digestão, produzindo diariamente cerca de 2,5 litros de suco gástrico (RANG *et al.*, 2001), criando o ambiente ideal para que o processo de digestão ocorra, e impedindo um crescimento microbiano exacerbado. O suco gástrico inclui quatro elementos: ácido clorídrico, pepsinogênio, fator intrínseco e muco. Assim, o baixo pH criado pelo ácido clorídrico, permite que o pepsinogênio se transforme em sua forma ativa, pepsina, e inicie a digestão de proteínas. O muco é liberado como forma de proteção da mucosa gástrica contra ação do próprio suco gástrico, e o fator intrínseco, está relacionado com a adequada absorção de vitamina B₁₂ (SHAMBUREK e SCHUBERT, 1993; COSTANZO, 1999).

3.3.2.1 Secreção de HCl

A liberação de ácido clorídrico para o lúmen estomacal, e conseqüente redução do pH, é um processo altamente regulado por meio de agentes excitatórios e inibitórios (HELANDER e KEELING, 1993). Este processo, realizado pela célula parietal, localizada no interior da glândula oxíntica (do grego *oxyntos* – fazer ácido), envolve intenso rearranjo membranoso, com ativação concomitante do sistema secretor (FORTE e YAO, 1996).

As células parietais perfazem um total aproximado de um bilhão de células; totalizando, na mucosa oxíntica, 16% do total celular. Elas são capazes de secretar,

durante a máxima estimulação, até 40 mEq de HCl por hora, reduzindo o pH estomacal até 0,8 (o que equivale à concentração de 150 mM de HCl) (HELANDER e KEELING, 1993; SHAMBUREK E SCHUBERT, 1993; BERNE e LEVY, 2000). São células grandes e de aspecto piramidal, sendo o lado luminal mais estreito que o basal. Possuem núcleo central e citoplasma vacuolizado, com grande concentração de mitocôndrias, responsáveis pelo fornecimento de ATP (necessário para a liberação de ácido). Além desses estão presentes um pequeno Complexo de Golgi e um escasso retículo endoplasmático granular (HELANDER e KEELING, 1993; STEVENS e LOWE, 1995).

A célula parietal apresenta dois estados fisiológicos, um de repouso e outro quando ocorre o estímulo para a secreção. Em ambos ocorre a liberação de ácido, mas em velocidades diferentes (de 1 a 5 mEq e de 6 a 40 mEq, respectivamente). Para suportar esse aumento de até 40 vezes na taxa de liberação de HCl, ocorrem profundas modificações celulares (BERNE e LEVY, 2000).

No estado de repouso, as células apresentam duas estruturas distintas interconectadas, um sistema de canalículos secretórios ramificados revestidos internamente por microvilosidades, que dirigem para a saída luminal da célula; e um sistema tubulovesicular, formado por extensos tubos e vesículas que recobrem praticamente todo interior celular (BERNE e LEVY, 2000). É na membrana do sistema tubulovesicular que ocorre a presença do sistema transportador de H^+ e Cl^- , que irá ser levado, após estimulação, para o lúmen gástrico (HELANDER e KEELING, 1993).

Ao receber estímulo adequado, ocorre uma mudança na organização interna do citoplasma. O sistema tubulovesicular funde-se com os canalículos secretórios, as custas de rearranjo no citoesqueleto celular, principalmente actina e microfilamentos (HELANDER e KEELING, 1993), bem como aumento da área superficial, devido à fusão de membranas, com aumento considerável nas microvilosidades dos canalículos secretórios (FORTE e YAO, 1996).

Para secretar ácido para o lúmen, a célula demanda de uma grande quantidade de energia, haja visto a concentração luminal deste íon ser 1000 vezes maior que a citoplasmática. Para suportar esse transporte contra corrente de íons H^+ , a célula parietal estimulada apresenta em sua membrana uma enzima capaz de

hidrolisar ATP, gerando energia química suficiente para realizar esse transporte (HELANDER e KEELING, 1993).

A H^+/K^+ ATPase é uma enzima ligada à membrana do canalículo, composta por duas sub-unidades, capaz de hidrolisar a molécula de ATP em fosfato inorgânico. A fosforilação temporária da enzima permite que esta modifique sua conformação espacial, transportando o H^+ intracelular para dentro do canalículo, e K^+ para o citoplasma da célula. Dessa maneira, esta enzima é descrita como um transportador de íons pertencente à família P das ATPases, sendo esse transporte seqüencial e eletroneutro, uma vez que não é gerada carga elétrica líquida durante o processo (HELANDER e KEELING, 1993).

Para assegurar o funcionamento da H^+/K^+ ATPase, a célula parietal possui outros sistemas de transporte iônico trabalhando em conjunto, mantendo assim o equilíbrio celular. Assim, inicialmente ocorre um transporte ativo de Cl^- , do citoplasma para a luz do canalículo, enquanto o Na^+ é transportado para o citoplasma. Esse efeito faz com que o K^+ seja lançado passivamente para o interior do canalículo, formando KCl (GUYTON e HALL, 1997).

Em outra etapa, a enzima anidrase carbônica, presente no citoplasma, converte H_2O e CO_2 em H_2CO_3 , que se dissocia em H^+ e HCO_3^- . Os íons hidrogênio são ativamente lançados para dentro do canalículo, ao mesmo tempo em que o íon potássio é retirado do canalículo pela enzima H^+/K^+ ATPase. Além desse transporte, o íon sódio é ativamente lançado para dentro do citoplasma, formando assim HCl. Esse transporte iônico, faz com que a água atravesse as membranas por osmose e dirija-se para o canalículo, formando assim a solução ácida (GUYTON e HALL, 1997).

Por fim, para equilibrar o pH intracelular, que ficou básico devido à formação de HCO_3^- , ocorre a troca desses íons por Cl^- , reiniciando o ciclo. Durante todo o processo a enzima Na^+/K^+ ATPase, presente em diversos tecidos, fica ativa, mantendo assim a alta concentração de íons potássio intracelular, para a manutenção do sistema (GUYTON e HALL, 1997).

3.3.2.2 Substâncias que alteram a secreção de HCl

Aumento da secreção

As células parietais possuem receptores para diferentes substâncias que estimulam a secreção gástrica

- ✓ Acetilcolina: é liberada pelos nervos vagos que inervam a mucosa e liga-se a receptores muscarínicos. Age via ativação da fosfolipase C, que, ao liberar diacilglicerol e IP_3 dos fosfolípidios de membrana, promove o aumento de cálcio intracelular. O Ca^{+2} juntamente com o diacilglicerol, aumentam a atividade da ATPase. Age também, estimulando a liberação de histamina (SHAMBUREK e SHUBERT, 1993; COSTANZO, 1998).
- ✓ Histamina: liberada pelas células ECL em resposta a gastrina circulante, difundindo-se para as células parietais próximas. Liga-se a receptores histamínicos H_2 que acoplados a proteína G, ativam a cascata da adenilato ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMP cíclico. Este aumenta a atividade da ATPase (BERNE e LEVY, 2000).
- ✓ Gastrina: Secretada pelas células G em resposta à presença de aminoácidos presentes no lúmen gástrico, é liberada na corrente sanguínea agindo em receptores específicos das células ECL promovendo a liberação de histamina e age também na célula parietal estimulando a secreção de HCl (COSTANZO, 1999).

Diminuição da secreção

- ✓ Somatostatina: é um peptídeo inibitório liberado pelas células D, seu provável mecanismo de ação está associado a inibição da liberação de histamina pelas células ECL (BERNE e LEVY, 2000).

- ✓ Prostaglandinas: exercem um efeito modulador na secreção ácida agindo por bloqueio do aumento de AMP cíclico estimulado pela histamina na célula parietal (BERNE e LEVY, 2000).

3.3.2.3 Úlcera péptica

As úlceras pépticas são causadas por dano ao revestimento gástrico pelas secreções gástricas, particularmente os ácidos. Elas são complicações da gastrite crônica sendo caracterizadas por intensa inflamação tecidual, sangramento grave do tecido, podendo levar a perfuração do tecido (STEVENS e LOWE, 1998).

As causas mais importantes associadas a úlcera péptica são estresse grave ou choque (após traumatismo ou queimaduras graves), hipotensão, hipóxia aguda do epitélio, uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais como a aspirina, ingestão excessiva de álcool ou associada a infecção por *Helicobacter pylori*, sendo a última a causa de 53 - 73 % dos casos de úlcera péptica em pessoas idosas (STEVENS e LOWE, 1998; PILOTTO, 2004).

Elas aparecem quando ocorre um desequilíbrio entre mecanismos agressores e protetores da mucosa gástrica. Quando mecanismos de proteção do epitélio gástrico se reduzem, como a diminuição da produção de muco e secreção de bicarbonato pelas células mucosas, ocorre a formação de ulcerações gástricas (COSTANZO, 1999).

Neste tipo de patologia, é comum o tratamento do paciente com drogas que levem a uma diminuição da liberação de HCl, e incluem agentes químicos que agem de diferentes maneiras (RANG *et al.*, 2001).

- ✓ Antagonistas dos receptores H_2 : inibem competitivamente as ações da histamina, inibindo a secreção ácida estimulada pela histamina e pela gastrina e reduzindo a secreção estimulada pela acetilcolina. Esses medicamentos diminuem em cerca de 90 %, e incluem a cimetidina e a ranitidina.
- ✓ Inibidores da bomba de prótons: provocam a inibição irreversível da $H^+/K^+ATPase$, que constitui a via final de eliminação de HCl. Tem-se como principal agente o omeprazol.

- ✓ Antiácidos: neutralizam o excesso de ácido presente no estômago. Incluem o hidróxido de magnésio e gel de hidróxido de alumínio.
- ✓ Tratamento de infecções por *H. pylori*: quelato de bismuto, por ter efeito tóxico sobre o bacilo e impedir sua aderência à mucosa e antibióticos.
- ✓ Protetores da mucosa: sulcrafato, forma geis complexos que liga-se com o muco, impedindo a ação da pepsina e limitando a difusão dos íons hidrogênio, e estimulando a produção de muco e bicarbonato. Misoprostol, é um análogo estável das prostaglandinas e inibe a secreção gástrica, mantém ou aumenta o fluxo sanguíneo local e a secreção de muco e bicarbonato.

O alto custo desses medicamentos é um fator importante, que muitas vezes limita a utilização desses produtos, o que justifica a busca por novas alternativas eficazes e seguras com plantas medicinais para o tratamento de dispepsias e outras lesões gástricas. Em estudos anteriores, foi observada a ação antiulcerogênica e antissecretora gástrica por extratos aquosos de *Achillea millefolium*, sendo esta atividade antissecretora associada a inibição da enzima $H^+/K^+ATPase$ (BAGGIO, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A *A. millefolium* utilizada neste estudo foi obtida junto à Fazenda Solidariedade, da Fundação de Ação Social (FAS). Foram utilizadas as partes aéreas isentas de inflorescências, coletadas a partir de dezembro de 2000. Após a retirada das flores, as as folhas foram secas em estufa, submetidas à catação do material e envasadas em sacos plásticos e exteriormente em sacos de papel. Os sacos, devidamente identificados foram enviados ao laboratório, onde foram armazenadas em local seco e com temperatura amena.

A planta foi identificada e a exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, sob registro UPCB número 45106.

4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Com as folhas, foram realizados estudos preliminares de modo a se identificar os metabólitos secundários presentes (NAKASHIMA, 1993 e 1994). De acordo com esta metodologia foram preparados, a partir das folhas de *Achillea millefolium*, extratos aquoso e hidroalcoólico, bem como a extração do óleo essencial. Cada extrato foi submetido aos seguintes ensaios.

- ✓ Extrato aquoso: determinação de cor, odor, sabor e pH, teor de sólidos %; e avaliação química quanto a presença de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e ácidos fixos e voláteis.

- ✓ Extrato hidroalcoólico: determinação de cor, odor, sabor e pH, teor de sólidos %; e avaliação química quanto à presença de alcalóides, leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cumarínicos, heterosídeos antraquinônicos, e esteróides e/ou triterpenos e saponinas

4.2.1 Extração do óleo essencial

Para detectar a presença de óleo essencial, foram utilizados 100 g de folhas secas e fragmentadas de *Achillea millefolium*. Estas foram submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, modificado por WASICKY (1963), anotando-se o rendimento bruto após 6 horas de extração contínua.

O óleo obtido foi separado e submetido à análise por CG/MS, para detecção dos componentes majoritários.

4.2.2 Preparo do extrato aquoso a 20 %

Foi preparado pelo método de maceração a quente (B.M., 60 °C). Utilizou-se 40 g de folhas secas e fragmentadas de *Achillea millefolium*, e 200 mL de água destilada como líquido extrator. Após o período de 2 horas, o líquido foi filtrado e o volume completado em proveta para 200 mL com água destilada.

4.2.2.1 Determinação de cor, odor, sabor, pH e teor de sólidos %

Os caracteres organolépticos foram determinados visual, olfativa e gustativamente. A determinação do pH foi realizada com fita indicadora universal de pH da marca Merck®.

Para determinação do teor sólidos foram colocados em cápsula de porcelana previamente aquecidas à 105 °C e resfriadas em dessecador, 10 mL de extrato. O material permaneceu em estufa a 105 °C por 6 horas, e, ao final desse período foi resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em gramas de sólidos por 100 g de folhas secas (g%).

4.2.2.2 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Alíquotas de 15 mL de extrato aquoso foram distribuídos igualmente em 3 tubos de ensaio. Em seguida, alterou-se o pH do extrato em cada um dos tubos; o primeiro foi alcalinizado com NaOH 10 % até pH 10; o segundo foi acidificado com HCl 10 % até pH 4, e o terceiro neutralizado até pH 7,0 com NaOH 10 %.

4.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Após o ensaio de heterosídeos antociânicos, os três tubos utilizados foram submetidos a agitação vigorosa por cinco minutos, e, em seguida, deixados em repouso por 30 minutos. Após este período mediu-se a altura da espuma formada. Espuma persistente com altura igual ou superior a 1 centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos. Para teste confirmatório foi adicionado 5 mL de etanol em cada tubo e repetido o experimento.

4.2.2.4 Pesquisa de heterosídeos cianogénicos

Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1 N em um tubo de ensaio contendo 5 mL de extrato aquoso, sem umedecer as paredes do tubo. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico e fechou-se o tubo com uma rolha de cortiça. O tubo foi aquecido a 60 °C em B.M. durante 30 minutos.

4.2.2.5 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico 1 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %.

b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 2 gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal 1 %.

c) Reação com acetado de chumbo 10 % (m/V)

A 5 mL do extrato aquoso, adicionou-se 5 mL de ácido acético a 10 % e gota a gota, 5 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 %.

d) Reação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9 %

Foram transferidos para tubos de ensaio: 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL do extrato aquoso. Adicionou-se em cada tubo 2,0 mL da solução de gelatina a 2,5%.

e) Reação com formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de fundo chato de 100 mL de capacidade, 30 mL do extrato aquoso; 6,0 mL de formaldeído e 4,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora. Foi filtrado a quente e separado o filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 %. Gotejou-se sobre o resíduo solução aquosa de hidróxido de sódio a 5%.

Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1 %.

4.2.2.6 Pesquisa de aminogrupos

Em uma cromatoplaça de sílica gel G60 F254 Merck[®] foram adicionados 5 gotas do extrato aquoso, em pontos previamente demarcados. Depois de seco, nebulizou-se a placa com solução de ninhidrina, levando-se à estufa (105 °C) durante 15 minutos

4.2.2.7 Pesquisa de ácidos fixos e voláteis

a) ácidos voláteis

Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL do extrato aquoso e acidificou-se com solução aquosa de ácido sulfúrico 1 N. Em seguida ferveu-se o líquido e determinou-se o pH dos vapores liberados.

b) ácidos fixos

Em um balão de fundo chato de 100 mL de capacidade, adicionou-se 20 mL de extrato aquoso ao qual foi acrescentado 2 mL de solução aquosa de NaOH 1 N. A mistura foi levada a ferver e mantida sob refluxo por 30 minutos. Após esfriar, o acidulou-se a mistura com ácido sulfúrico 1 N e por meio de funil de separação e realizada extração com 10 mL de éter etílico em duas vezes consecutivas. Os extratos etéreos foram reunidos, tratado com carvão ativado, filtrado e levado a secar em B.M. a 60 °C. Após aquecimento do resíduo durante 10 minutos em estufa a 100 °C e posterior resfriamento, foram adicionados 5 mL de solução aquosa

de NH_4OH 1 N. Após filtração, foi transferido 3 gotas do extrato amoniacal para uma folha de papel de filtro, obtendo-se uma mancha de aproximadamente 1 centímetro sobre a qual foi colocada uma gota de reativo de Nessler e colocado em estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos.

4.2.3 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20 %

Foi preparado pelo método de maceração a quente (B.M., $60\text{ }^\circ\text{C}$). Utilizou-se 40 g de folhas secas e fragmentadas de *Achillea millefolium*, e 200 mL de solução hidroalcoólica (etanol 70 % em água destilada) como líquido extrator. Após o período de 1 hora, o líquido foi filtrado e o volume completado em proveta para 200 mL com solução hidroalcoólica.

4.2.3.1 Determinação de cor, odor, sabor, pH e teor de sólidos %

Os caracteres organolépticos foram determinados visual, olfativa e gustativamente. A determinação do pH foi realizada com fita indicadora universal de pH da marca Merck[®].

Para determinação do teor de sólidos, foram colocados em cápsula de porcelana previamente aquecidas à $105\text{ }^\circ\text{C}$ e resfriadas em dessecador, 10 mL de extrato. O material permaneceu em estufa a $105\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas, e, ao final desse período foi resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em gramas de sólidos por 100 g de material vegetal (g%).

4.2.3.2 Pesquisa de alcalóides

A pesquisa de alcalóides foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand). Foi evaporado à secura 50 mL de extrato hidroalcoólico em B.M. a $60\text{ }^\circ\text{C}$, em seguida, o resíduo foi dissolvido com 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1 %. Foi transferido para 5 tubos de ensaio, 1 mL do líquido e gotejou-se os reativos gerais. Para resultado confirmatório foram transferidos 15 mL do extrato hidroalcoólico para um béquer e levado ao B.M até a evaporação do etanol. Após, foi transferido a um funil de separação, alcalinizou-se com hidróxido de amônio até pH 10. Extraiu-se com uma mistura de éter:clorofórmio (3:1). O extrato etéreo levado ao B.M para evaporação

do éter e o resíduo foi dissolvido em solução aquosa de HCl 1 % e distribuídos em tubos de ensaio para os testes com os reativos gerais anteriormente citados.

4.2.3.3 Pesquisa de leucoantocianidina

Foram tomados 10 mL do extrato hidroalcoólico e agitados 2 vezes com 15 mL de acetato de etila; a fração acetato de etila foi então concentrada até 5 mL. A reação foi feita pela adição de HCl concentrado e aquecimento à ebulição.

4.2.3.4 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

A pesquisa de flavonóides foi realizada pela reação de Schinoda ou reação da cianidina, após extração seletiva. Tomou-se 20 mL do extrato alcoólico total, o qual foi submetido a uma extração com hexano para retirar os compostos apolares, resinas e pigmentos, e em seguida a uma extração com acetato de etila, em duas vezes de 15 mL. Esta última fração foi concentrada a 5 mL e submetida à reação.

Para a reação, foram adicionados, em tubos de ensaio, 5 mL do extrato orgânico, 200 mg de limalha de magnésio e 2 mL de HCl concentrado.

4.2.3.4 Pesquisa de heterosídeos cumarínicos

Foi transferido para um béquer, 30 mL do extrato hidroalcoólico e acidificado até pH 1, concentrado em banho-maria a 60 °C até 10 mL. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de água destilada e extraído em funil de separação com éter etílico com três volumes de 10 mL. Reduziu-se o volume do extrato orgânico até 5 mL em banho-maria a 60 °C. Em uma folha de papel de filtro, depositou-se 3 gotas de extrato etéreo, formando-se 3 manchas distintas. Nas duas primeiras manchas, foram colocados uma gota de NaOH 1 N, sendo a segunda, coberta por uma moeda. A terceira mancha foi utilizada como referência. Esse sistema foi deixado sob luz ultravioleta ondas longas (366 nm) durante 15 minutos.

O restante do extrato etéreo foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se 2 mL de NaOH N. Este foi deixado sob luz ultravioleta ondas longas (366 nm).

4.2.3.5 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Este ensaio foi realizado pela reação de Borntraeger, com NH_4OH . Em um balão de fundo chato de 100 mL de capacidade, foram transferidos 30 mL do extrato hidroalcoólico e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro. Ao filtrado foi adicionado 30 mL de água deionizada, transferido para um funil de separação e extraído com éter etílico por duas vezes de 10 mL. A fase orgânica foi separada e concentrada em banho-maria a 60 °C até 5 mL e transferido para tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1 N.

4.2.3.6 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Em um béquer, foram evaporados à secura 30 mL do extrato hidroalcoólico em banho-maria a 60 °C. O resíduo seco foi dissolvido com 5 mL de clorofórmio e filtrado. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico para tubos de ensaio e o volume completado para 2,0 mL com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio, 1 mL de anidrido acético e 1 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de Liebermann-Bouchard).

4.3 ATIVIDADE H^+/K^+ ATPase: PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

4.3.1 Obtenção dos extratos

Foram preparados 3 extratos com diferentes graduações alcoólicas para a determinação da atividade da enzima H^+/K^+ ATPase.

Foram utilizados 360 g de material vegetal ao qual adicionou-se 1600 mL de etanol 90 %. A mistura ficou sob maceração em B.M. a 60 °C por 2 horas, e ao final desse período foi filtrado ainda quente. Esta operação foi repetida por mais 3 vezes. O líquido filtrado foi reunido, concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 60 °C, e o volume final aferido, em balão volumétrico, para 1000 mL. O extrato final, aferido, foi considerado como sendo, extrato hidroalcoólico a 90 % de *Achillea millefolium* (EH90) e mantido em refrigeração até o momento do uso.

Em seguida, com o material vegetal restante da extração com etanol 90 %, foi realizado a extração com etanol 70 % e feito o mesmo procedimento descrito acima. O extrato final, aferido, foi considerado como sendo, extrato hidroalcoólico a 70 % de *Achillea millefolium* (EH70) e mantido em refrigeração até o momento do uso.

Novamente, com o restante do material vegetal, foi realizado a extração com etanol 50 % nos mesmos parâmetros utilizados anteriormente. O volume final aferido para 1000 mL, foi considerado como sendo extrato hidroalcoólico a 50 % de *Achillea millefolium* (EH50) e mantido em refrigeração até o momento do uso.

Para efeito de controle do processo extrativo, foi realizado a determinação do resíduo seco de cada um dos extratos. Tomou-se em cadinho de porcelana, previamente seco a 105 °C e resfriado em dessecador, 10 mL de cada extrato e mantido em estufa a 105 °C, resfriado e pesado, repetindo-se o processo até peso constante. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em gramas de sólidos por 100 g de folhas secas (g%) (Figura 10).

Folhas secas de *Achillea millefolium*

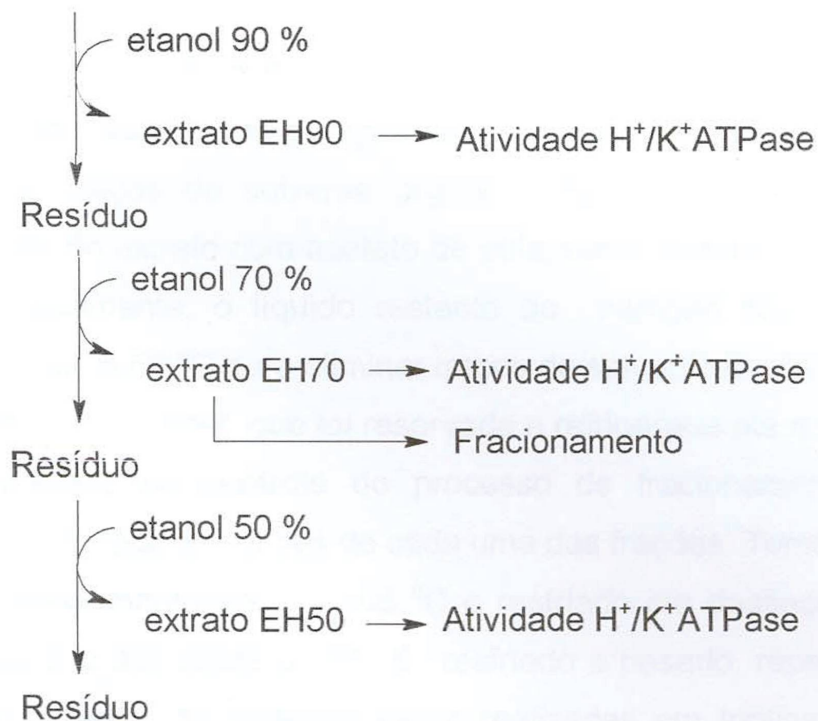


Figura 10: Fluxograma da obtenção dos extratos das folhas de *Achillea millefolium*

4.3.2 Fracionamento do extrato

O extrato hidroalcoólico 70 % (EH70) foi submetido a fracionamento, de modo a promover a separação das diferentes substâncias presentes no extrato de acordo com suas polaridades em diferentes solventes orgânicos, iniciando o processo de caracterização de um provável grupo químico responsável pela atividade do extrato. Neste processo foram obtidas 5 frações descritas a seguir.

O extrato foi centrifugado em frações de 100 mL a 6000 rpm por 10 minutos. O resíduo obtido foi reservado e refrigerado até o momento do uso. Com o sobrenadante, foi realizado o fracionamento com solventes de polaridade crescente. Inicialmente tomou-se, em funil de separação de 1000 mL de capacidade, 200 mL de extrato; o qual foi fracionado com 50 mL de *n*-hexano. O processo foi repetido até que todo volume de extrato fosse fracionado, e esse sistema repetido por mais 3 vezes. A fração orgânica foi reunida, concentrada em evaporador rotativo a 60 °C, e o volume final aferido, em balão volumétrico, para 50 mL. A fração obtida foi reservada e refrigerada até o momento do uso.

O líquido restante da partição com *n*-hexano foi deixado em B.M. a 60 °C para eliminar traços de solvente orgânico. Após esse período, procedeu-se o fracionamento do extrato com clorofórmio, como descrito na etapa anterior.

O líquido restante da partição com clorofórmio foi deixado em B.M. a 60 °C para eliminar traços de solvente orgânico. Após esse período, procedeu-se o fracionamento do extrato com acetato de etila, como descrito no fracionamento com *n*-hexano. Novamente, o líquido restante da partição com acetato de etila foi deixado em B.M. a 60 °C para eliminar traços de solvente orgânico e denominada de fração hidroalcoólica final, que foi reservada e refrigerada até o momento do uso.

Para efeito de controle do processo de fracionamento, foi realizado a determinação do teor de sólidos de cada uma das frações. Tomou-se em cadinho de porcelana, previamente seco a 105 °C e resfriado em dessecador, 1 mL de cada fração e mantido em estufa a 105 °C, resfriado e pesado, repetindo-se o processo até peso constante. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em gramas de sólidos por 100 g de folhas secas (g%) (Figura 11),

Fracionamento

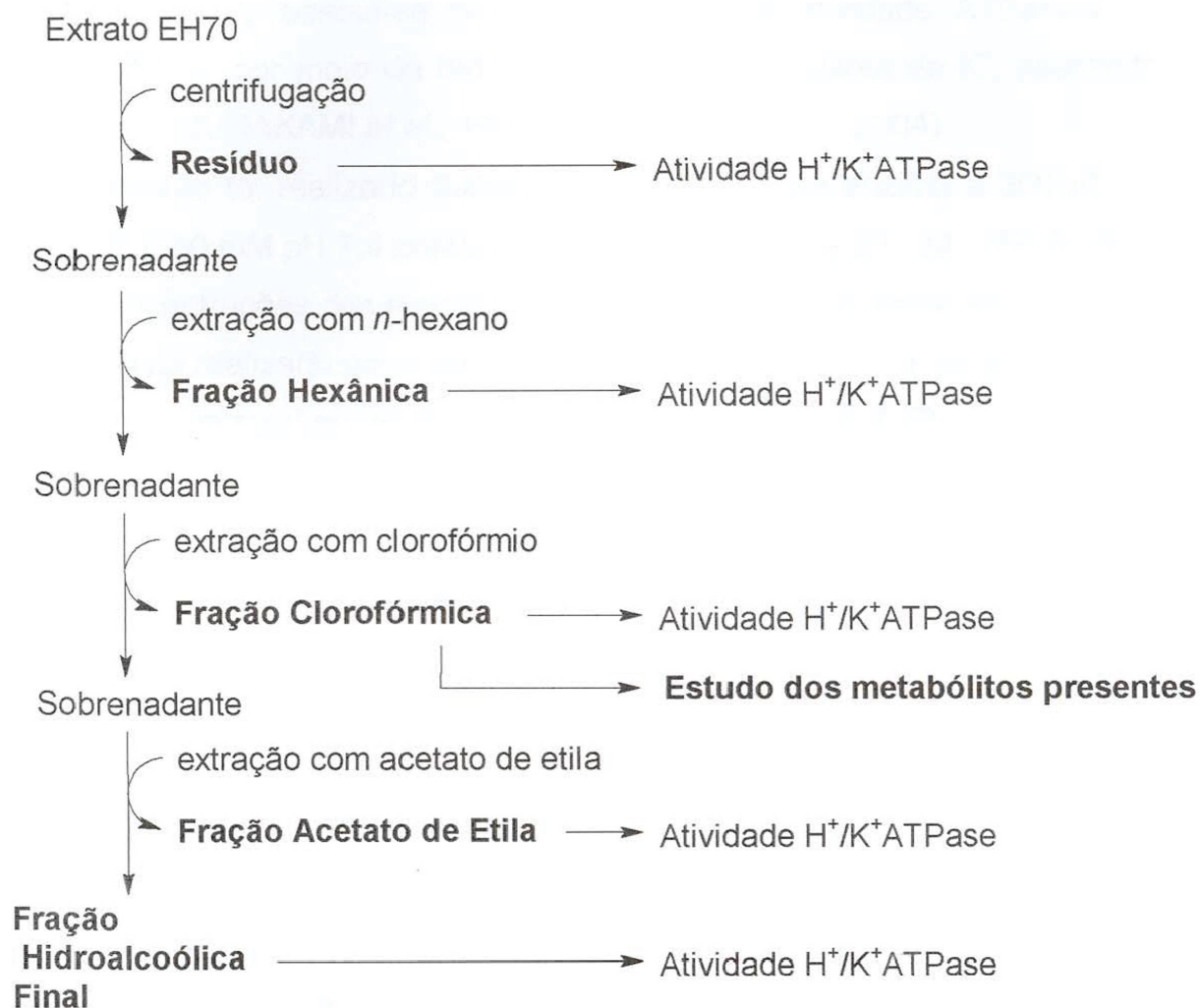


Figura 11: Fluxograma de fracionamento do extrato hidroalcoólico 70 % das folhas de *Achillea millefolium*.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $H^+/K^+ATPase$

Para este ensaio foi utilizado a enzima $H^+/K^+ATPase$ isolados da mucosa gástrica de coelho, em uma concentração de $0,28 \mu g/\mu L$ (KUBO *et al.*, 1995 citado por BAGGIO, 2004).

Ensaio de atividade enzimática

Este experimento baseia-se na determinação da atividade ATPásica da enzima $H^+/K^+ATPase$, por meio da hidrólise de ATP dependente de K^+ , liberando fósforo inorgânico (MURAKAMI *et al.*, 1992 citado por BAGGIO, 2004).

O experimento foi realizado adicionando-se 4,2 μg de enzima a 300 μL de tampão TRIS.HCL 50 mM pH 7,4 contendo KCl 200 mM; $MgCl_2$ 20 mM; ATP 5 mM e as diferentes concentrações dos extratos e frações. A seguir adicionou-se a enzima. Para este ensaio foi realizado um controle contendo somente ATP; e um branco para cada uma das concentrações de extrato e para o controle de ATP, onde não foi colocado a enzima. As placas foram incubadas por 20 minutos a 37 °C em estufa, e após este período foi adicionado 60 μL de ATC 50 % de modo a parar a reação, e determinou-se o fosfato inorgânico produzido.

Determinação do fosfato inorgânico

Para determinação do fosfato inorgânico foi utilizada metodologia descrita por FISKE e SUBBAROW, 1925; modificado por TERSARIOL (1989); citado por BAGGIO (2004).

Neste ensaio, foram adicionados à amostra 900 μL de reagente específico, contendo 3,33% de ácido ascórbico; 7,78 % de ácido sulfúrico 10 N; 6,67 % de molibdato de amônio 2,4 %; sendo as soluções preparadas previamente e misturadas no momento do uso e o volume final completado com água bidestilada. Após a adição do reagente, as amostras foram incubadas por 20 minutos a 37 °C em estufa, e a coloração obtida, quantificada por espectrofotometria a 820 nm.

Atividade enzimática

A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do P_i ($\epsilon = 11\ 000/M/cm$)

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50 (CI_{50})

As CI_{50} foram calculadas plotando-se os dados obtidos na equação $V_i/V_o = 1/(1-[I]/CI_{50})$ usando o Programa para Windows, *Kaleida Graph* (Synergy Software), onde V_i representa a atividade inibitória e V_o representa a atividade total.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são representados como as médias \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni. Quando apropriado foi utilizado o teste *t* de Student não pareado. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software*). Um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

4.7 ESTUDO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA

Face a atividade da fração clorofórmica frente a inibição da H⁺/K⁺ATPase, procedeu-se a identificação dos prováveis grupos químicos presentes na fração por meio de CCD, de acordo com resultados da prospecção fitoquímica.

Foi utilizado nesse estudo, placas cromatográficas sílica gel G60 F254 Merck[®], em suporte de alumínio, variando-se a fase móvel e revelador de acordo com os grupos estudados (WAGNER *et al.*, 1983)

a) Flavonóides

F.M: Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100:11:11:27)

Revelador: NEU

b) Amidas

Para a detecção de possíveis aminas presentes, foi realizado uma hidrólise prévia do material, utilizando-se 5 mL da fração clorofórmica, diluído em 25 mL de água e acidificação do meio 2 mL de H₂SO₄ 1N até pH 2

F.M. n-butanol:ácido acético:água (50:10:40) – fase superior

Revelador: Reativo de Nihidrina (0,3 % em etanol)

c) Esteróides e/ou triterpenos

F.M: Tolueno : acetato de etila (93:7)

Revelador: Vanilina sulfúrica (estufa 110 °C)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

O ensaio para determinação do teor de óleo essencial foi realizado em duas fases, uma em março de 2003 e outra em julho de 2004. Obteve-se, nas duas extrações, um óleo essencial de coloração azul escura. Este dado é confirmado pela literatura (PLCHOVÁ *et al.*, 1975). Entretanto a quantidade de óleo alterou-se drasticamente, obtendo-se no primeiro caso 0,6 mL% de óleo e no segundo 0,2 mL%. Considerando o tempo de estocagem do material vegetal, observa-se a perda significativa de óleo quando comparado aos resultados obtidos por NAKASHIMA (2000), que obteve de uma amostra recém colhida 0,9 mL% de óleo essencial também de coloração azul escura.

A análise fitoquímica preliminar demonstrou a presença de ácidos fixos, aminogrupos, esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos flavônicos, taninos condensados e hidrolisáveis.

Tabela 2: Resultados da análise fitoquímica preliminar

Metabólito	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
Cor	marrom	verde-escuro
Odor	mate	mascarado pelo etanol
Sabor	amargo	levemente anestésico
pH	5	6
Teor de sólidos	19,11 g %	17,65 g%
Ácidos voláteis	–	n.r
Ácidos fixos	++	n.r
Alcalóides	n.r	–
Aminogrupos	++	n.r
Esteróides e/ou triterpenos	n.r	+++
Heterosídeos cumarínicos	n.r	–
Heterosídeos flavônicos	n.r	+++
Heterosídeos antraquinônicos	n.r	–
Heterosídeos antociânicos	–	n.r
Heterosídeos cianogênicos	–	n.r
Heterosídeos saponínicos	–	n.r
Leucoantocianidinas	n.r	–
Taninos condensados	++	n.r
Taninos hidrolisáveis	++	n.r

Pode-se observar, no entanto, que os resultados variam daqueles descritos na literatura, pois segundo CHANDLER, 1982, foi descrito na espécie a presença do alcalóides na *Achillea millefolium*, compostos estes não encontrados neste estudo. Entretanto este mesmo autor, destaca a presença de diversas bases na espécie, o que é reforçado pelos dados observados nos ensaios preliminares realizados.

Além desses, as amidas, um outro grupo de compostos destacados na literatura, podem estar relacionados com os dados encontrados (GREGER, 1984). Isto pode ser explicado pelo fato de que, as amidas citadas, derivam de ácidos graxos olefínicos e acetilênicos, que poderiam estar presentes na forma livre no vegetal resultando em análise positiva no ensaio de ácidos fixos. O mesmo ocorre para a porção nitrogenada da amida, que, sendo derivada de aminoácidos, poderiam estar presentes na planta como precursores para síntese das amidas. Além disso, segundo GREGER (1984), compostos amídicos quando em contato com a língua podem levar a formigamento e parcial insensibilidade do tecido, o que pode ser observado no extrato hidroalcoólico, levando a considerar a presença deste tipo de composto no material em estudo.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA H⁺/K⁺ATPase

5.2.1 Extratos EH90, EH70 e EH50

A análise do teor de sólidos dos extratos hidroalcoólicos a 90 %, 70 %, e 50 % de *Achillea millefolium*, apresentaram a seguinte composição. Extrapolando-se os resultados obtidos em 10 mL de extrato utilizados na análise, estimou-se também o total de material extraído em cada etapa.

Tabela 3: Teor de sólidos, coloração e quantidade total de material extraído nos extratos de *Achillea millefolium*

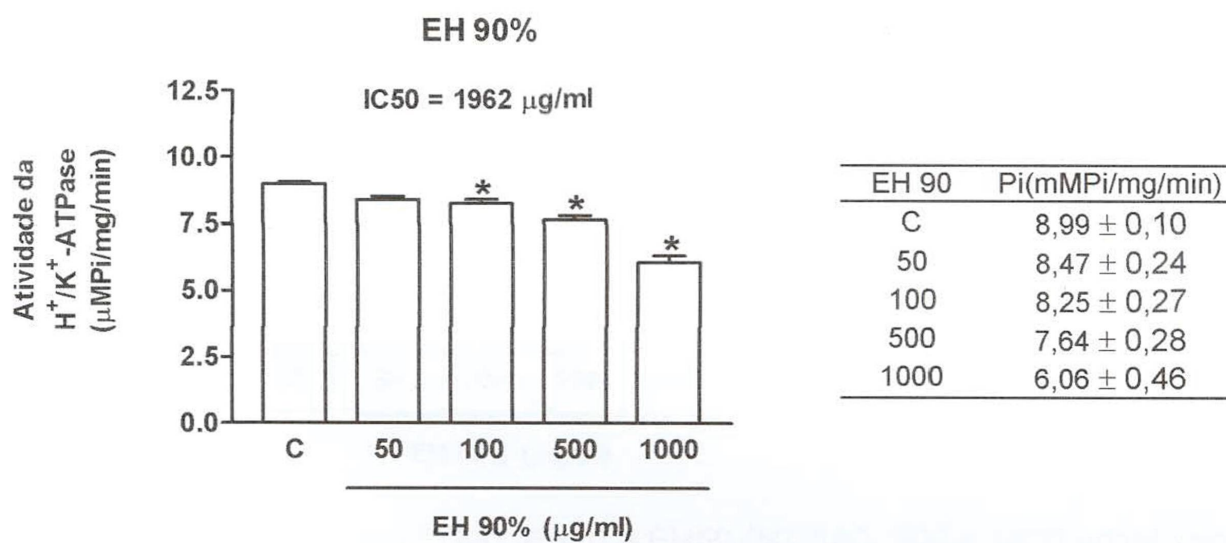
Extrato	Coloração	Sólidos (g%)	Quantidade total em 360 g de folhas(g)
90 %	verde escuro	10,36	33,16
70 %	marrom	15,17	48,54
50 %	castanho	6,76	21,63
Total		32,29	103,33

Pode-se observar que apesar do líquido extrator ser etanol, a alteração na graduação alcoólica permitiu a extração de diferentes substâncias, observados na alteração da quantidade de material extraído, bem como pela coloração do extrato obtido.

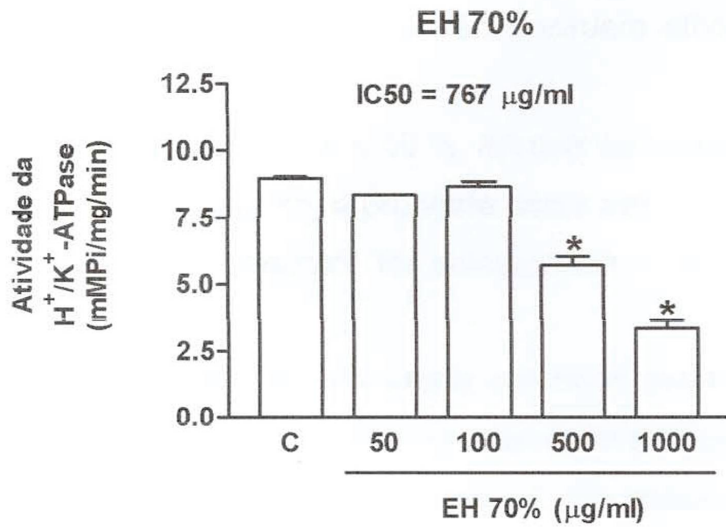
5.2.2 Efeito dos extratos EH90, EH70 e EH50, sobre a atividade da enzima $H^+/K^+ATPase$

Com os experimentos realizados, pode-se observar que os extratos EH90, EH70 e EH50, reduziram a hidrólise de ATP pela $H^+/K^+ATPase$ com CI_{50} de 1962, 767 e 956 $\mu g/mL$, respectivamente (FIGURA 10a, 10b e 10c).

a) Extrato EH90

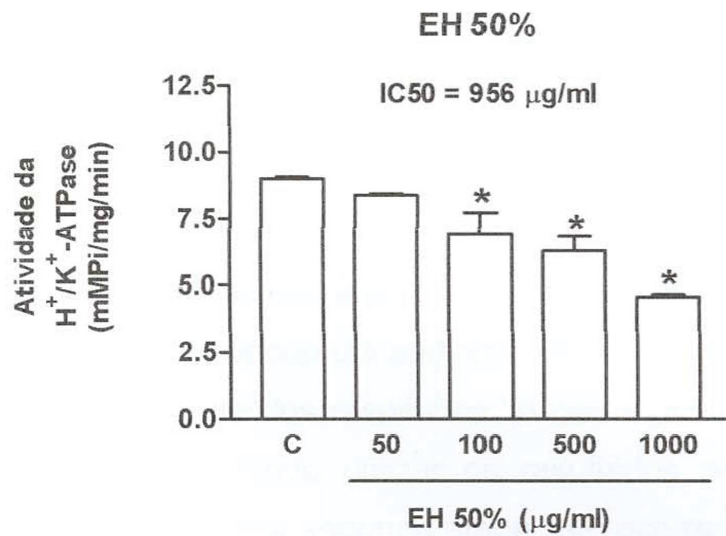


b) Extrato EH70



EH 70	Pi(mMPI/mg/min)
C	$8,99 \pm 0,10$
50	$8,35 \pm 0,03$
100	$8,66 \pm 0,35$
500	$5,72 \pm 0,60$
1000	$3,33 \pm 0,56$

c) Extrato EH50



EH 50	Pi(mMPI/mg/min)
C	$8,99 \pm 0,10$
50	$8,36 \pm 0,12$
100	$6,91 \pm 1,38$
500	$6,29 \pm 0,92$
1000	$4,58 \pm 0,16$

Figura 12: Efeito do extrato EH90, EH70 e EH50 (50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre atividade da $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{ATPase}$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de determinações em triplicada. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni.

* Diferente do grupo controle para $p < 0,05$

Com base nesses nos resultados obtidos podemos inferir que a extração prévia do material com etanol 90 % é válida uma vez que são extraídos diversas substâncias, resinosas, que não possuem atividade significativa frente a inibição enzimática.

Os extratos 70 % e 50 %, apresentam uma atividade razoável frente a inibição da enzima, entretanto, a proposta deste trabalho é dirigir os estudos para as frações mais ativas, e portanto, foi selecionado o extrato EH70 para a continuidade do trabalho.

Para tanto foi preparado um novo extrato EH70 com maior quantidade de material, para assim, haver material suficiente para a etapa de fracionamento desse extrato. Assim a análise do extrato EH70 obtido 1000 g de folhas secas apresentou os seguintes resultados.

Tabela 4: Coloração, teor de sólidos e quantidade total de material extraído, obtido no extrato EH70 de *Achillea millefolium* a partir de 1000 g de planta

Coloração	Sólidos (g%)	Quantidade total em 1000 g de folhas (g)
marrom	17,7	177

Observa-se que a alteração na quantidade de material vegetal inicial de 360 g para 1000 g provocou um aumento (16,6 %) no teor de sólido de obtido, entretanto, pela proximidade dos resultados, pode-se dizer que a extração nos dois casos foi semelhante, podendo utilizar os resultados preliminares da primeira fase como estimativa para esta segunda etapa. Isto ocorre porque, no processo de maceração, alterações na quantidade de líquido extrator ou de material vegetal, não são exatamente proporcionais com a quantidade de material extraído.

5.2.3 Fracionamento do extrato EH70

A análise das frações do extrato hidroalcoólico 70 % obtido na extração de 1000 g de folhas apresentou os seguintes resultados. Extrapolando-se os resultados obtidos em 1 mL de extrato utilizados na análise, estimou-se também o total de material extraído em cada etapa.

Tabela 5: Coloração, teor de sólidos e quantidade total de material extraído, obtido nas frações do extrato EH70 de *Achillea millefolium* a partir de 1000 g de planta

Fração	Coloração	Sólidos (g%)	Quantidade total (g)
resíduo	verde escura	1,751	17,51
<i>n</i> -hexano	verde escura	0,0112	0,112
clorofórmio	verde escura	0,179	1,790
acetato de etila	marrom	0,4876	4,876
hidroalcoólica final	castanha	14,595	145,95
Total		17,23	170,238

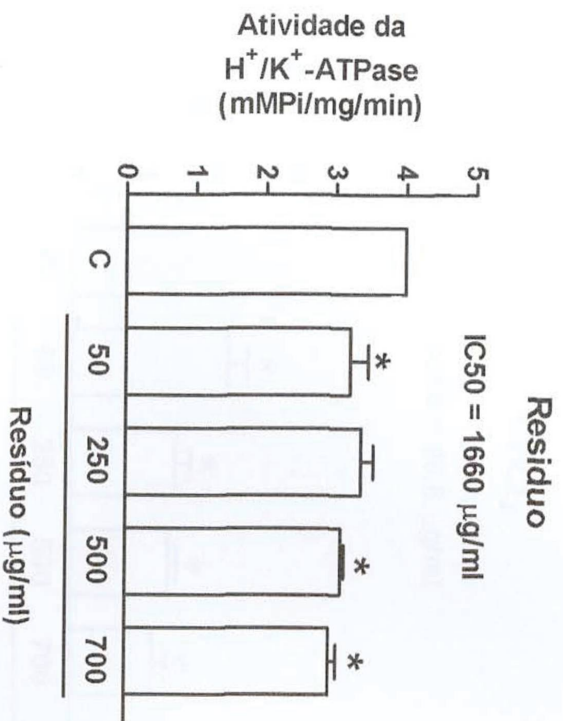
Os resultado da quantidade total de material obtido das frações, somando-se cada fração individual, difere do resultado obtido para a fração EH70 devido a perdas durante cada fase. A distribuição relativa do material extraído em cada um dos solventes, revela que o extrato EH70, apresenta maior quantidade de compostos polares (frações acetato de etila e hidroalcoólica final) quando comparado a compostos apolares (frações anteriores).

Este dado está em acordo com o processo de preparo do extrato EH70, pois a extração prévia do material com etanol 90 % extraiu grande parte dos materiais resinosos presentes no vegetal, que normalmente seriam retidos na fase hexânica.

5.2.4 Efeito do resíduo e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica final sobre a atividade da enzima $H^+/K^+ATPase$

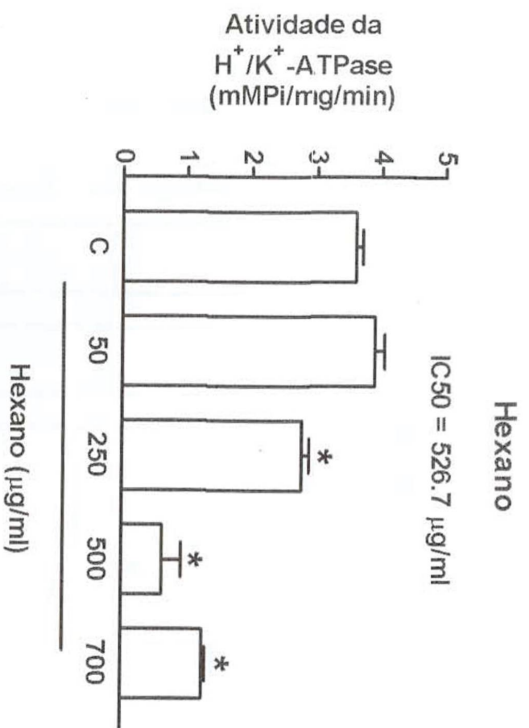
Com os experimentos realizados, pode-se observar que os extratos EH90, EH70 e EH50, reduziram a hidrólise de ATP pela $H^+/K^+ATPase$ com CI_{50} de 1660; 526,7; 96,6 414 e 373,4 $\mu g/mL$, respectivamente (FIGURA 11a, 11b, 11c, 11d e 11e).

a) Resíduo



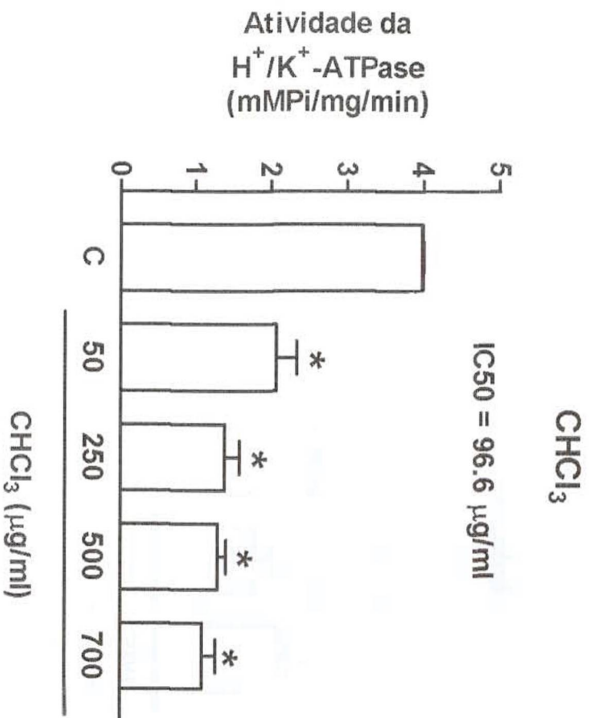
Resíduo	Pi(mM Pi/mg/min)
C	3,99 ± 0,01
50	3,212 ± 0,44
250	3,371 ± 0,24
500	3,08 ± 0,08
700	2,91 ± 0,18

b) Fração hexano



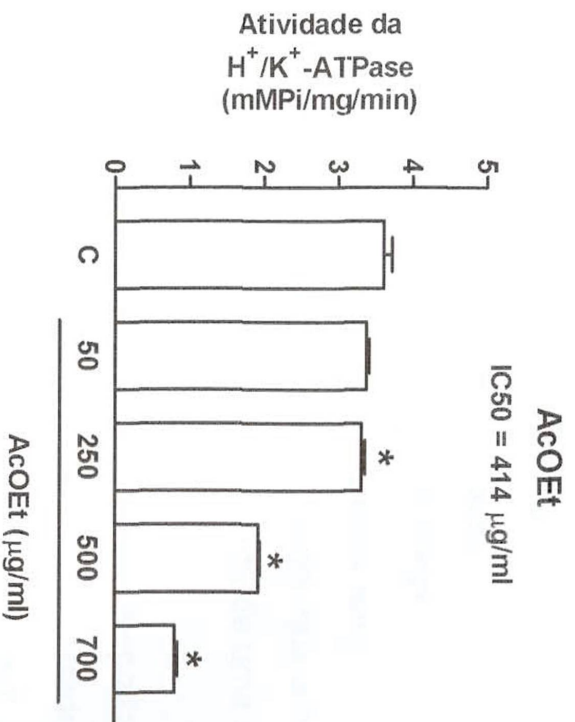
Hexano	Pi(mM Pi/mg/min)
C	3,61 ± 0,18
50	3,90 ± 0,26
250	2,782 ± 0,19
500	0,62 ± 0,52
700	1,251 ± 0,08

c) Fração clorofórmica



CHCl ₃	Pi(mMPPi/mg/min)
C	3,61 ± 0,18
50	3,90 ± 0,26
250	2,782 ± 0,19
500	0,62 ± 0,52
700	1,251 ± 0,08

d) Fração Acetato de Etila



AcOEt	Pi(mMPPi/mg/min)
C	3,61 ± 0,18
50	2,07 ± 0,46
250	1,39 ± 0,33
500	1,29 ± 0,20
700	1,09 ± 0,31

e) Fração Hidroalcoólica final

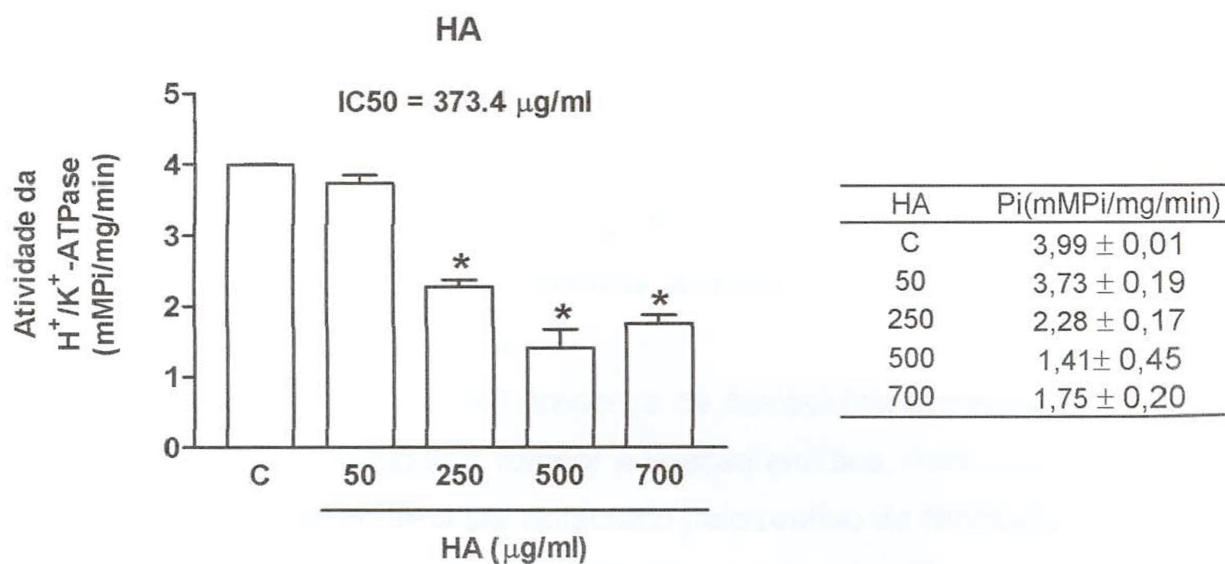


Figura 11: Efeito do resíduo e das frações (50, 250, 500 e 700 $\mu\text{g/ml}$) sobre atividade da $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de determinações em triplicada. A comparação estatística entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. * *Diferente do grupo controle para $p < 0,05$

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que o resíduo obtido no início do processo apresenta atividade pouco significativa, sugerindo que a presença de princípios ativos responsáveis pela redução da atividade da enzima $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, está em menor quantidade.

Das frações estudadas, a mais ativa foi a clorofórmica, uma vez que a CI_{50} desta fração é cerca de 4 vezes menor que a fração hidroalcoólica final e, merece atenção quanto ao possível isolamento de uma substância ativa com potencial para inibir a atividade enzimática.

A fração hidroalcoólica também desperta interesse, pois apesar de possuir uma atividade inibitória menor, a quantidade de material isolado durante na extração, é muito maior, favorecendo, também o isolamento de alguma substância ativa.

As frações hexânica e acetato de etila, apesar de possuírem boa atividade frente a inibição da enzima quando comparado ao omeprazol que é a droga clássica utilizada como agente inibidor da enzima $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, tem seu estudo dificultado

uma vez que a quantidade de material isolado é pouca e sua atividade é bem menor que a fração clorofórmica.

5.3 ESTUDO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA

Após a realização das cromatografias para os metabólitos presentes no extrato hidroalcoólico à 20 %, observou-se a ausência de flavonóides e esteróides e/ou triterpenos na fração clorofórmica.

Para avaliarmos a possível presença de compostos amídicos, foi realizado a hidrólise do material, de modo a romper a ligação amídica, liberando o grupo amino livre. Desta forma este poderia ser detectado pelo reativo de Nihidrina.

A cromatografia foi feita utilizando-se a fração clorofórmica sem hidrólise e após, uma e duas horas de hidrólise. Como padrão foi utilizado extrato aquoso à 20 %.

Após a revelação da cromatoplaça, observou-se que o ponto relativo à fração clorofórmica não hidrolisada, não ocorreu desenvolvimento de coloração, enquanto que nas frações hidrolisadas, houve o desenvolvimento de coloração alaranjada, com Rf de 0,05.

Isso indica que durante a hidrólise, houve a formação de amins livres que reagiram com a nihidrina. Este resultado é indicativo da presença de compostos amídicos, porém não conclusivos, visto que testes mais apurados devem ser realizados para identificação da presença deste tipo de composto.

6 CONCLUSÃO

O rendimento em óleo essencial obtido das folhas de *Achillea millefolium* L., foi de 0,6mL e 0,2 mL%, de coloração azul escuro e odor característico. Teve como componentes identificados pela análise em GC/MS azuleno (10 %), 1,8-cineol (8,20 %), cariofileno (8,0 %) e outros compostos em menor concentração.

Na prospecção fitoquímica dos extratos aquoso e hidroalcoólico, foram observados a presença de: aminogrupos, taninos, ácidos fixos, esteróides e/ou triterpenos e glicosídeos flavônicos. Os extratos apresentaram um odor aromático, amargo e levemente anestésico.

O estudo dos extratos das folhas de *Achillea millefolium*, indicou um resultado positivo frente a inibição da enzima $H^+/K^+ATPase$, sendo a fração clorofórmica a que mostrou melhores resultados. Os dados obtidos, sugerem a presença de amidas nesta fração, sendo estas provenientes de ácidos graxos (ácidos fixos) e aminas, os quais podem ser observados na prospecção fitoquímica

Entretanto, o isolamento e identificação total dos compostos presentes na fração ativa não foi possível, devendo ser necessários maiores estudos para a confirmação dos resultados.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a espécie *Achillea millefolium* L. é uma planta que apresenta boa atividade frente à inibição da $H^+/K^+ATPase$, e, portanto, seu estudo terá continuidade afim de identificar o(s) composto(s) responsável(is) por essa atividade

REFERÊNCIAS

- BALBACHAS, A.; **As plantas que curam**. 11. e. São Paulo: Editora Missionária, 1960. p. 290 – 291.
- BAHN-NHU, C.; GÁCS-BAITZ, E.; RADICS, L.; TAMÁS, J.; UJSZÁSZY, K.; VERZÁR-PETRI, G.; Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 331 – 332, 1979.
- BAGGIO, C. H.; **Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Achillea millefolium* L.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BARROSO, G. M. *et al.* **Sistemática de angiospermas no Brasil**. v. 3. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; **Fisiologia**. 4. e. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 555-609.
- CANDAN, F.; MEHMET, U.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; PALISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, H. A.; Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215 – 220, 2003.
- CAVALCANTI, A. M. **Determinação da toxicidade pré-clínica do extrato aquoso das partes aéreas isentas de inflorescências de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) em ratos**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HARVEY, M. J.; Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. **Economic Botany**, v.36, n.2, p.203 – 223, 1982.
- COSTANZO, L. S.; **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 266-306.
- CRONQUIST, A. J. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. p. 1021-1028.
- DALSENTER, P. R.; CAVALCANTI, A. M.; ANDRADE, A. J. M.; ARAÚJO, S. L.; MARQUES, C. A. M.; Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**. v 18, p. 819-823, 2004.

- DENFFER, D. von; EHRENDORFER, F.; BRESINSKY, A.; ZIEGLER, H.; **Tratado de botânica**. 7. e. Edição Espanhola. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1990. p. 594, 522-523, 533, 889 – 892.
- EVANS, W. C.; **Trease and evan's pharmacognosy**. 13. e. London: Baillière Tindall, 1989. p. 96 –109.
- FISCHER, U.; VETTER, S.; NOVAK, J.; GLASL, S.; SAUKEL, J.; FRANZ, C.; Inheritance of the sesquiterpenes logipinenone and hydroxy-longipinenone within the *Achillea millefolium* complex (Compositae). **Plant Breeding**, v. 120, p. 251 – 254, 2001.
- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y.; The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, n. 2, p.375 – 400, 1925
- FORTE, J. G.; YAO, X. The membrane-recruitment-and-recycling hypotesis of gastric HCl secretion. **Trends in Cell Biology**, v.6, p. 45 – 48, 1996
- GREGER, H.; Alkamides: Structural relationships, distribution and biological activity. **Planta Medica**, v.50, n.5, p. 365 – 375., 1984.
- GREGER, H.; HOFER, O.; Polyenoic acid piperideides and other alkamides from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2363 – 2368, 1989.
- GUEDÓN, D.; ABBE, P.; LAMAISON, J. L.; Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 5. p. 607 – 611, 1993.
- HEEMANN, A. C. W.; **Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (ASTERACEAE)**. Curitiba, 2002. . Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- HELANDER, H. F.; KEELING, D. J; Cell biology of gastric acid secretion. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v.7, n.1, p. 1 – 21, 1993.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for treatmente of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027 – 1031, 2002.
- JOLY, A. B.; **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 628 – 638.
- JOHNS HOPKINS**: Gastroenterology & hepatology resource center. disponível em: <http://hopkins-gi.nts.jhu.edu/pages/latin/templates/?CFID=608016&CFTOKEN=60969643> <acesso em 25 jan. 2005>

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc, 1999. p. 396 – 401.

KAKKALOU, E.; KOKKINI, S.; HANLIDOU, E.; Volatile Constituents of *Achillea millefolium* in Relation to their infraspecific variation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 7, p. 665 – 670, 1992.

KUBELKA, W.; KASTNER, U.; SABINE, G.; SAUKEL, J.; JURENITSCH, J.; Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 437 – 444, 1999.

KUBO, K.; UEHARA, A.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORIYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KOHGO, Y.; Effects of ranitidine on gastric vesicles containing H⁺,K⁺-Adenosine triphosphatase in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, p. 944 – 951, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas medicinais no brasil, nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002 p. 129 – 130.

MBG:W3TROPICOS. **Missouri botanical garden**. disponível em <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html> <acesso em 12 jan. 2005>

MEHLFÜHRER, M.; TROLL, K.; JURENITSCH, J.; AUER, H.; KUBELKA, W.; Betaines and free proline within the *Achillea millefolium* group. **Phytochemistry**. v. 44, n. 6, p 1067 – 1069, 1997.

MILLER, F. M.; CHOW, L. M.; **Alkaloids of *Achillea millefolium* L. I. Isolation and characterization of achilleine**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, p. 1353 – 1354, 1954.

MODELI ANATOMICI. disponível em: <http://www.modelli-anatomici.it/JS/catalogo.htm> <acesso em 25 jan. 2005>

MOCKUTE, D.; JUDZENTIENE, A.; Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1033 – 1045, 2003.

MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E. de; DOLDER, H. Antispermatogetic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. **Contraception**, v. 58, 309 – 313, 1998.

MOREIRA, E. A.; Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 13-39, 1979.

MURAKAMI, S.; ARAI, I.; MURAMATSU, M.; OTOMOS, S.; BABA, K.; KIDO, T.; KOZAWA, M.; Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by cassigarol A: A polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 33 – 37, 1992.

NAKASHIMA, T.; **Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques et antivirales des trois verbenaceae: *Lippia alba* N. E. Brown, *Lippia multiflora* Mold. *Citharexylum myrianthum* Cham.** Toulouse - France, 1993. Thèse (Docteur) - L'Institut National Polytechnique de Toulouse.

NAKASHIMA, T.; **Manual práctico de Fitoquímica.** Curitiba: Departamento de Farmácia, UFPR, 25p, 1994. (Apostila).

NAKASHIMA, T.; **Álbum de fotografias** – Referente a dissertação Avaliação fitoquímica e determinação do potencial de inibição da enzima H⁺/K⁺ATPase de *Achillea millefolium* L., Asteraceae, Curitiba, 2002/2004.

NAKASHIMA, T.; LAGO, J.B.; BOLLER, C.; FROZZA, J.; FÁVERO, K.A.B.; GONÇALVES, J. A.; MARCONDES, A. A.; Extração e avaliação comparativa de duas amostras do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. Asteraceae. **Anais da 8ª reunião da SBPN**, v.4, n.1, p. 94 – 95, 2000.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D.; **Plantas medicinais: um guia para profissional de saúde.** São Paulo: Editorial Premier, 2002. p. 194 – 196.

OCHIR, G.; BUDESINSKY, M.; MOTL, O.; 3-Oxa-guaianolides from *Achillea millefolium*. *Phytochemistry*, v. 30, n 12, p. 4163 – 4165, 1991.

OLIVEIRA, L. N. P. de; **Verde Saúde Curitiba: plantas medicinais.** Curitiba: Prefeitura Municipal de Curitiba, 1999. p. 50 – 51.

PAULSEN, E.; ANDERSEN, K. E.; HAUSEN, B. M. Sensitization and cross-reaction patterns in Danish Compositae-allergic patients. **Contact Dermatitis**, v. 45, p. 197-204, 2001.

PDR for Herbal medicines. 2.e. New Jersey: Medical economics company, 2000. p. 833 – 835.

PILOTTO, A.; Aging and upper gastrointestinal disorders. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 73-81, 2004.

PIO CORREIA, M.; **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** 1.e. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1969. vol IV. p. 53 – 54

PLCHOVÁ, S.; SPURNÁ, V.; KARPFEK, Z.; Intra- and interspecific differentiation within the *Achillea* genus. **Planta Médica**, v. 19, n. 1, p.75 – 82, 1975.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**. 4. e. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 305 – 317.

SCHRÖDER, H.; KASTENER, U.; GARGULA, K.; BUDESINKY, M.; HASLINGER, E.; JURENITSCH, J.; KUBELKA, W.; Artabsin and 3-oxa-artabsin derivatives from *Achillea millefolium* species. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1449 – 1451, 1994.

SHAMBUREK, R. D.; SCHUBERT, M. L.; Pharmacology of gastric acid inhibition. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v.7, n.1, p. 23 – 54, 1993.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. p. 42, 50, 744-745.

STEVENS, A.; LOWE, J. S.; **Histologia**. 1. e. São Paulo: Editora Manole, 1995. p.160 – 165.

STEVENS, A.; LOWE, J. S.; **Patologia** 2.e. São Paulo: Editora Manole, 1998. p.221-224.

TERSARIOL, I.; **Bases moleculares da atividade hemorrágica da heparina. Envolvimento do sistema contrátil celular no controle da hemostasia primária**. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, 1989.

ULUBULEN, A.; ÖKSÜZ, S.; SCHUSTER, A.; A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 3948 – 3949, 1990.

VALANT-VETSCHERA, K. M.; WOLLENWEBER, E.; Leaf flavonoids of the *Achillea millefolium* group part II: Distribution patterns of free alkycones if leaf exudates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 7/8, p. 605 – 614, 1988.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M.; **Drogenanalyse – dünnschichtchromatographische analyse von arzneidrogen**. Berlin: Springer-Verlar, 1983

WASICKY, R.; Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Rev. Farm. Bioq.** v.1, n.1, p. 77-81, 1963.

