



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC n.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/11/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Bruna de Paula Belini

Propriedades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

**Umuarama
2025**

Bruna de Paula Belini

Propriedades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientadora: Suelen Pereira Ruiz Herrig

Co-orientadora: Zilda Cristiani Gazim

Umuarama
2025

Ficha Catalográfica

B431p Belini, Bruna de Paula.

Propriedades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium* / Bruna de Paula Belini. – Umuarama : Universidade Paranaense - UNIPAR, 2025.
27 f.

Orientadora: Dr^a. Suelen Pereira Ruiz Herrig.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense - UNIPAR.

1. Mil-folhas. 2. Atividade antibacteriana. 3. Conservante natural. 4. Extrato etanólico. I. Universidade Paranaense - UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 615.321

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

Propriedades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

Dissertação aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig
Universidade Paranaense – UNIPAR

Dra. Zilda Cristiani Gazim
Universidade Paranaense – UNIPAR

Dra. Beatriz Cervejeira Bolanho Barros
Universidade Estadual de Maringá

Universidade Paranaense – UNIPAR
Umuarama, 20 de fevereiro de 2025

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1.1. Material Vegetal.....	8
2.1.2. Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>Achillea millefolium</i>	8
2.2. Identificação química do extrato etanólico das folhas de <i>Achillea millefolium</i> por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-MS).....	9
2.3. Determinação do teor de fenóis totais.....	9
2.4. Determinação do teor de flavonoides totais.....	10
2.5. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Achillea millefolium</i>	10
2.5.1 Atividade antioxidante pelo sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico...10	
2.5.2. Método de sequestro dos radicais livres DPPH.....	10
2.5.3. Método de redução do ferro (FRAP).....	11
2.6 Atividade Antioxidante Celular (AAC).....	11
2.7. Atividade antiproliferativa.....	12
2.8. Inibição da produção de óxido nítrico.....	13
2.9. Atividade antibacteriana.....	14
2.9.1. Microrganismos e preparo do inóculo.....	14
2.9.2. Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo.....	14
2.9.3. Avaliação antibacteriana da combinação de extrato etanólico das folhas de <i>Achillea millefolium</i> e sorbato de potássio.....	15
3. Análise Estatística.....	15
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Composição química.....	15
4.2. Fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante.....	16
4.3. Atividade antibacteriana.....	18
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÕES.....	23
7. AGRADECIMENTOS.....	24
8. REFERÊNCIAS.....	24

Bruna de Paula Belini

Propriedades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

RESUMO: *Achillea millefolium* (mil-folhas) é uma planta pertencente à família *Asteraceae*, conhecida popularmente como mil-folhas. É utilizada na medicina tradicional para tratar infecções, febres e feridas. Possui propriedades antioxidantes, antibacterianas e antiinflamatórias, devido a compostos como ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos. Apresentam características de grande interesse para a conservação de alimentos e prevenção de contaminações. Além disso, ela pode ajudar a combater o estresse oxidativo, que danifica o DNA e pode causar doenças. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição química, determinar o teor de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante, inibição de produção de óxido nítrico, atividade antiproliferativa e antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*. O extrato foi obtido a partir de folhas por meio de maceração utilizando álcool etílico 96%. A composição química foi caracterizada por UHPLC-MS. Realizou-se a determinação de fenóis e flavonoides totais. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando diferentes métodos como, sistema β -caroteno/ácido linoleico, método de sequestro dos radicais livres (DPPH), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) e atividade antioxidante celular. Avaliou-se também a atividade antiproliferativa, inibição da produção de óxido nítrico e atividade antibacteriana. Por fim foi realizada a análise estatística. Foram identificados 16 compostos no extrato etanólico de *Achillea millefolium*, sendo os majoritários: Ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido p-hiroxibenzoico, vanilina, rutina e ácido quínico. Na atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, a inibição da oxidação atingiu 55,17%. No método DPPH, o extrato apresentou IC₅₀ de 0,959 mg/mL, indicando capacidade de neutralizar radicais livres. Enquanto método FRAP, o poder redutor foi de 1,35 μ M Fe²⁺/mg. Em relação à atividade antiproliferativa, as células tumorais apresentaram IC₅₀ de 201 a 250 mg/mL, sendo inferior quando comparado ao controle elipticina, porém o extrato trata-se de uma mistura complexa de compostos, diferindo de quando se analisa uma substância padrão pura. Para células VERO não apresentou atividade antiproliferativa celular para célula não tumoral. O extrato etanólico apresentou ação inibidora da produção de óxido nítrico com 111 mg/mL. A atividade antibacteriana foi avaliada contra diferentes bactérias pelo método de microdiluição em caldo, determinando-se as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) pelo método de microdiluição. O extrato mostrou maior eficácia contra *Staphylococcus aureus* (CIM = 10,00 mg/mL), superando o desempenho do conservante sorbato de potássio (CIM = 50,00 mg/mL). Além disso, foi avaliada a combinação do extrato com sorbato de potássio, demonstrando sinergismo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhi*. Os resultados confirmam o potencial antioxidante e antibacteriano do extrato de *Achillea millefolium*. Sua eficácia em sinergia com sorbato de potássio é promissora para formulações que buscam reduzir a quantidade de conservantes sintéticos, contribuindo para a segurança e a qualidade dos alimentos. A continuidade das investigações, especialmente sobre os mecanismos de sinergismo e os efeitos em sistemas complexos, pode consolidar seu uso industrial.

Palavras-chave: Mil-folhas. Atividade antibacteriana. Conservante natural. Extrato etanólico.

Bruna de Paula Belini

Biological properties of the ethanolic extract of *Achillea millefolium* leaves

ABSTRACT: *Achillea millefolium* (yarrow) is a plant belonging to the *Asteraceae* family, commonly known as yarrow. It is used in traditional medicine to treat infections, fevers, and wounds. It has antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties due to compounds such as phenolic acids, flavonoids, and terpenes. These properties are of great interest for food preservation and contamination prevention. Furthermore, it may help combat oxidative stress, which damages DNA and can lead to diseases. In this context, the present study aimed to evaluate the chemical composition, determine the total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity, inhibition of nitric oxide production, antiproliferative activity, and antibacterial activity of the ethanolic extract of *Achillea millefolium* leaves. The extract was obtained from the leaves through maceration using 96% ethyl alcohol. The chemical composition was characterized by UHPLC-MS. The total phenolic and flavonoid content was determined. Antioxidant activity was assessed using different methods, such as the β -carotene/linoleic acid system, DPPH free radical scavenging method, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), and cellular antioxidant activity. The antiproliferative activity, inhibition of nitric oxide production, and antibacterial activity were also evaluated. Finally, statistical analysis was performed. Sixteen compounds were identified in the ethanolic extract of *Achillea millefolium*, with the major compounds being chlorogenic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillin, rutin, and quinic acid. In the antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid system, oxidation inhibition reached 55.17%. In the DPPH method, the extract showed an IC_{50} of 0.959 mg/mL, indicating its capacity to neutralize free radicals. In the FRAP method, the reducing power was 1.35 μ M Fe^{2+} /mg. Regarding antiproliferative activity, tumor cells showed an IC_{50} ranging from 201 to 250 mg/mL, which was lower compared to the ellipticine control. However, the extract is a complex mixture of compounds, differing from the analysis of a pure standard substance. For VERO cells (non-tumor cells), no antiproliferative activity was observed. The ethanolic extract showed inhibition of nitric oxide production at 111 mg/mL. The antibacterial activity was evaluated against various bacteria using the broth microdilution method, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The extract showed greater efficacy against *Staphylococcus aureus* (MIC = 10.00 mg/mL), outperforming potassium sorbate (MIC = 50.00 mg/mL). Additionally, the combination of the extract with potassium sorbate was evaluated, demonstrating synergy against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella Typhi*. The results confirm the antioxidant and antibacterial potential of the *Achillea millefolium* extract. Its effectiveness in synergy with potassium sorbate is promising for formulations aiming to reduce the amount of synthetic preservatives, contributing to food safety and quality. Continued research, especially on the mechanisms of synergy and effects in complex systems, could solidify its industrial use.

Key-words: Yarrow. Antibacterial activity. Natural preservative. Ethanolic extract.

1. INTRODUÇÃO

Achillea millefolium (Pollard) D.D. Keck é uma planta pertencente à família *Asteraceae*, originária da Europa e amplamente aclimatada no Brasil (Lorenzi; Matos, 2002), sendo popularmente conhecida como mil-folhas. É utilizada na medicina tradicional no tratamento de infecções, febres, cicatrizações, inchaços e feridas (Lopes *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Suas propriedades fitoterápicas são reconhecidas mundialmente, especialmente pelos seus extratos alcoólicos e óleo essencial, incluindo atividades antioxidantes, antibacterianas (Candan *et al.*, 2003), antiinflamatórias, antitumorais e antidiabéticas (Ali *et al.*, 2017).

Essas propriedades estão relacionadas aos compostos bioativos presentes na planta, como ácidos fenólicos (ácidos clorogênicos e dicafeoilquínicos), flavonóides (apigenina, luteolina e quercetina) e terpenos voláteis (borneol, cânfora, 1,8-cineol e camazuleno) (FAIKU, 2018). Tais características fazem de *A. millefolium* uma alternativa viável para aplicações na indústria farmacêutica, bem como na indústria de alimentos, como conservante natural, com potencial para substituir aditivos sintéticos (Bassolé; Juliani, 2012). Em busca de alternativas, muitos pesquisadores têm se dedicado a identificar antioxidantes potentes e não tóxicos provenientes de fontes naturais, especialmente plantas comestíveis ou medicinais (Shameela, 2018).

A produção excessiva de radicais livres pode causar danos oxidativos às biomoléculas do corpo, como lipídios, proteínas e DNA (Aslanturk, 2013). No organismo humano, esses radicais podem ser neutralizados por diversos mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos. Quando esses mecanismos de defesa não são eficazes, o estresse oxidativo pode danificar proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Substâncias que provocam danos no DNA celular são chamadas de genotoxinas (Srividya *et al.*, 2013).

O dano ao DNA é uma das principais consequências do estresse oxidativo nas células. Quando a reparação do DNA não consegue corrigir esses danos induzidos, a instabilidade genômica pode resultar em mutações, câncer, envelhecimento e diversas outras doenças (Sabahi *et al.*, 2018). Para combater esse estresse, o corpo humano conta com diversos mecanismos que produzem antioxidantes, os quais podem ser gerados internamente ou obtidos externamente, por meio da alimentação e/ou suplementos (Valko *et al.*, 2006).

Além dos efeitos da oxidação no organismo humano, pode também ocorrer a oxidação em alimentos, uma questão relevante na indústria alimentícia, pois causa deteriorações tanto físicas quanto químicas, além de perdas nutricionais (Waraho *et al.*, 2011). Esse processo leva

à alteração do sabor, ao surgimento de odores e sabores característicos de ranço, o que pode levar à rejeição do produto pelo consumidor e à sua degradação (Shahidi; John, 2013).

Fora os efeitos químicos, as doenças causadas por microrganismos também são consideradas um problema de saúde pública, principalmente em decorrência da contaminação dos alimentos. Estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem anualmente devido a doenças transmitidas por alimentos (DTHAs), resultando em 420.000 mortes, das quais 40% são em crianças menores de cinco anos (Ministério da saúde, 2022). enquanto a contaminação por microrganismos patogênicos pode provocar DTHAs.

Os principais agentes etiológicos incluem *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* e *Shigella* spp. (Ministério da saúde, 2023). Para minimizar esses riscos, a indústria de alimentos adota estratégias de conservação, como controle de umidade, temperatura e oxigênio, além de aditivos sintéticos, como BHA e BHT. No entanto, o uso desses compostos tem sido questionado devido a potenciais efeitos adversos à saúde, incentivando a busca por alternativas naturais (Galvão *et al.*, 2008; Azevedo; Leonardi, 2018).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, atividade antioxidante, inibição de produção de óxido nítrico, antiproliferativa e antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *A. millefolium*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1. Material Vegetal

Foram coletadas folhas de *Achillea millefolium* no horto Medicinal da UNIPAR – Umuarama - PR; região noroeste do estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas S23° 46.225' e WO 53° 16.730', altitude de 391m. A identificação botânica foi realizada e uma exsicata está depositada no Herbário Educacional da Unipar (H.E.U.) sob o nº 1896.

2.1.2. Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

As folhas foram secas em esteira à 35 °C, pulverizadas a uma granulometria de 850 µm. O pó obtido foi submetido ao processo de maceração dinâmica com renovação do solvente utilizando álcool etílico 96% (v/v) até o esgotamento do material vegetal. Em seguida, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório (modelo Tecnal TE-211) à 40 °C, até a obtenção do extrato etanólico.

2.2. Identificação química do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-MS)

O extrato etanólico das folhas de *A. millefolium* (volume de injeção de 5 μ L) foi analisado por espectrometria de massas - MS/UHPLC (Shimadzu modelo 8050 MS e NEXERA X2 HPLC). As fases móveis: água Milli-Q acidificada com ácido fórmico 0,1% (A) e metanol, grau MS, Merck (B) foram operadas em modo gradiente linear: 1-9 min (20% B), 10-15 min (40% B) e 16-30min (10% B). A corrida foi realizada a 40°C por 20 minutos, utilizando uma coluna C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm, Shimadzu). O detector MS/MS foi operado em modo scan por 15 min, monitorando os modos positivo e negativo para cada íon precursor, e suas respectivas transições, que foram identificadas e otimizadas no modo multiple reaction monitoring (MRM). A quantificação dos compostos detectados foi realizada utilizando o Software Insight (Shimadzu), com base nas curvas analíticas (10 a 250 μ g/L) dos seguintes fenólicos: catecol, morina, isovanilina, ácido gálico, quercetina, hidroxibenzaldeído, naringenina, siringaldeído, ácido clorogênico, ácido sirínico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzóico, naringina, ácido p-cumárico, ácido cafeico, aldeído coniferílico, ácido sinápico, siringaldazina, catequina, sinapaldeído, luteolina, rutina, teobromina, epicatequina, baicalina, crisina, ácido quínico, ácido málico, kaempferol, cumarina, cafeína, ácido resorcílico, ácido nicotínico e ácido fumárico (Damião *et al.*, 2024).

2.3. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Souza de Sá *et al.*, 2012). As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1,0 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL. A solução reagente foi composta por 155 μ L da solução de Folin-Ciocalteu, 125 μ L de solução de carbonato de sódio e 20 μ L da amostra diluída (1 mg/mL) em cada poço da microplaca. A mistura foi deixada em repouso na ausência de luz por 60 min e a leitura foi realizada em aparelho SpectraMax Plus³⁸⁴ Microplate Reader a 740 nm, em triplicata. A curva de calibração foi obtida pelo uso de diluições de ácido gálico (0-100 μ g/mL). Os resultados foram expressos como μ g de equivalente de ácido gálico (EAG)/mg de amostra.

2.4. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado através do método colorimétrico com cloreto de alumínio segundo Alves e Kubota (2013). Realizou-se a diluição do extrato em etanol: água (80:20 volumes/volumes) para obtenção de concentrações que variaram de 1,0; 0,75; 0,50 e 0,25 mg/mL. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato nas diferentes diluições foi misturada a 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (m/v) em etanol e mantida à temperatura ambiente durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em aparelho SpectraMax Plus384 Microplate Reader a 425 nm, em triplicata. Como controle analítico, utilizou-se a solução de cloreto de alumínio. A concentração de flavonoides totais foi calculada de acordo com curva padrão de quercetina (5 – 40 µg/mL) e os resultados foram expressos em µg equivalentes de quercetina (EQ) por mg de extrato.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*

2.5.1. Atividade antioxidante pelo sistema de co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico

A capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas foi avaliada em sistema modelo de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico, segundo Rufino *et al.* (2006a) com modificações. Este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Para preparar a solução sistema β-caroteno/ácido linoléico, foram adicionados em um erlenmeyer, 40 µL de ácido linoléico, 530 µL de Tween 40, 50 µL da solução β-caroteno 20 mg/mL e, para solubilizar, adicionou-se 1 mL de clorofórmio, homogeneizou-se e, posteriormente, o clorofórmio foi evaporado com o auxílio do oxigenador. Em seguida, adicionou-se a água tratada com oxigênio até obter uma absorbância entre 0,6 nm e 0,7 nm a 470 nm. Em uma microplaca com 96 poços, foi adicionado em cada poço alíquotas de 280 µL desta emulsão e 20 µL do extrato etanólico nas concentrações de 1,0; 0,75; 0,5 e 0,25 mg/mL. Em seguida, a placa foi colocada no aparelho SpectraMax Plus³⁸⁴ Microplate Reader, sendo mantida a 40 °C, durante 120 minutos com leituras realizadas a cada 5 minutos, e a absorvância mensurada a 470 nm. Uma solução de trolox 0,2 mg/mL foi utilizada como padrão-referência. A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação (%).

2.5.2. Método de sequestro dos radicais livres DPPH

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando o método do sequestro de radicais livres do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) descrita por Rufino *et al.* (2007), que se baseia em

um ensaio fotométrico onde o radical livre DPPH que apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, se reduz em presença de moléculas antioxidantes, formando o 2,2-difenil-1-picrilhidrazine. Um volume de 0,1 mL do extrato etanólico nas concentrações de 1,0; 0,75; 0,5 e 0,25 mg/mL, foi adicionado a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH. Para o controle negativo utilizou-se 0,1 mL de metanol na solução de DPPH. Após 30 minutos fez-se as leituras das absorvâncias das amostras a 515 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (PerkinElmer). A capacidade antioxidante total do extrato etanólico das amostras foram calculadas usando uma solução padrão de quercetina (60 μ M), como referência de 100% (MOLYNEUX, 2004). A partir de uma correlação entre absorvância *versus* concentração da amostra antioxidante, determinou-se a concentração da amostra antioxidante necessária para reduzir 50% dos radicais livres da amostra (IC_{50}). A absorvância do radical livre da mistura referente ao IC_{50} foi obtida por uma correlação entre absorvância e concentração do radical livre.

2.5.3. Método de redução do ferro (FRAP)

Este método foi descrito por Rufino *et al.* (2006b) e baseia-se na redução do complexo Fe^{3+} -tripiridiltriazina para um complexo azul Fe^{2+} -tripiridiltriazina. Isto ocorre em pH ácido pela ação de um antioxidante doador de elétrons. Para o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foram combinados 25 mL de tampão acetato (0,3 M), 2,5 mL de uma solução aquosa de 2,4,6-Tris (2-piridil)-striaizina (TPTZ - 10 mM), 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM) e 3 mL de água destilada. Para a reação de atividade antioxidante, em uma microplaca de 96 poços 10 μ L do extrato etanólico foram misturados a 290 μ L do reagente FRAP em cada poço. A placa foi colocada no aparelho SpectraMax Plus³⁸⁴ Microplate Reader e mantida a 37 °C por 30 minutos. A variação da absorvância foi lida a 595 nm. A percentagem de atividade antioxidante foi calculada em relação a uma curva padrão de sulfato ferroso (1000 μ M).

2.6. Atividade Antioxidante Celular (AAC)

Para avaliar a atividade antioxidante celular do extrato etanólico, foram dissolvidos em H_2O e DMSO (dimetilsulfóxido) (50:50, 1 mL), a fim de se obter uma concentração de 8 g/mL, a partir da qual foram feitas diluições sucessivas com 2', 7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) preparada com etanol e diluída com HBSS (50 μ M), obtendo-se as concentrações a serem testadas (32,5 - 2000 μ M). Para o método da atividade antioxidante celular (CAA), foram utilizadas culturas de células de macrófagos de camundongo (RAW 264.7). As células foram

destacadas da caixa com um raspador de células e uma solução de 70.000 células/mL foi preparada. Uma alíquota da suspensão de células de macrófagos (300 µL) foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo transparente preto (SPL Lifesciences). As placas foram incubadas por 48 horas nas condições mencionadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C e sob atmosfera úmida, de forma a garantir adequada adesão e multiplicação celular. Após esse período, o meio de crescimento foi descartado e as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 µL), tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico (200 µL; 32,5 - 2000 µM) e incubadas por 1 hora (WOLFE; LIU, 2007).

2.7. Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa em células tumorais foi realizada em quatro linhagens de células tumorais: AGS (adenocarcinoma gástrico), Caco-2 (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma pulmonar). Também foi investigada a ação do extrato etanólico em linhagem celular não tumorais utilizando as células VERO (célula epitelial de macaco). Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 g/mL) e estreptomicina (100 g/mL), com exceção para as células Vero que foram mantidas no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) médio suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina e antibióticos. Os frascos contendo as culturas de células foram incubados em estufa contendo 5% CO₂ a 37°C em atmosfera úmida. As células foram utilizadas somente quando apresentaram confluência de 70 a 80%. Uma massa conhecida do extrato etanólico (8 mg) foi dissolvida em H₂O e DMSO (dimetilsulfóxido) na proporção de (50:50), a fim de obter as soluções de estoque inicial com concentração de 8 mg/mL. A partir desta concentração foram realizadas diluições sucessivas, obtendo as concentrações do extrato etanólico que variaram de (0,125 - 8 mg/mL). Cada uma das concentrações do extrato (10 µL) foram incubadas com a suspensão de células (190 µL) das linhagens testadas em microplacas de 96 poços por 72 horas. As microplacas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂, em atmosfera úmida, após verificar a aderência das células. Todas as linhas celulares foram testadas em uma concentração de 10.000 células/poço. Após o período de incubação, as células foram ajustadas: O ácido tricloroacético (TCA) (10% p/v; 100 µL) foi previamente resfriado e as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C, lavadas com água e, após secagem, foi adicionada uma solução SRB (0,057%, m/v; 100 µL), permanecendo a temperatura ambiente por 30 minutos. Para remover o SRB não aderido, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de ácido acético (1% v/v) e colocadas para

secar a temperatura 37°. Finalmente, o SRB aderido foi solubilizado com Tris (10 mM, 200 µL) e a absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi lida em um leitor de microplacas Biotek ELX 800. Os resultados foram expressos em termos de concentração do extrato etanólico com capacidade de inibir o crescimento celular em 50% - GI₅₀. Como controle positivo foi utilizado a elipticina (Roriz *et al.*, 2021).

2.8. Inibição da produção de óxido nítrico

O extrato etanólico foi dissolvido em H₂O e DMSO (50:50, 1 mL), para obter uma concentração final de 8 mg/mL. A partir da qual foram realizadas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a serem testadas (0,125 - 8mg/mL). Macrófagos de camundongo da linhagem celular RAW 264.7, obtido da DMSMZ- Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, foram cultivados em meio DMEM, suplementado com soro fetal inativado por calor (SFB) (10%), glutamina e antibióticos, e mantidos incubados a 37°C, com 5% de CO₂ sob atmosfera úmida. As células foram separadas com um raspador de células. Em cada poço foi adicionada uma alíquota da suspensão de células de macrófagos (300 µL) com densidade celular de 5 x 10⁵ células/mL e proporção de células mortas abaixo de 5% de acordo com o teste de exclusão com azul de Tripán. As microplacas foram incubadas por 24h nas condições previamente indicadas de forma a permitir adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. millefolium* (15 µL, 0,125 - 8 mg/mL) e incubadas por uma hora, sendo a faixa de concentração testada de 6,25 - 400 µg/mL. A estimulação foi realizada com a adição de 30 µL da solução de lipossacarídeo - LPS (1 mL/mL) e incubada por mais 24 horas. Dexametasona (50 mM) foi utilizada como controle positivo e as amostras na ausência de LPS foram usadas como um controle negativo. A quantificação do óxido nítrico foi realizada por meio do kit do sistema de reagentes Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e por meio da curva de calibração do nitrito (nitrito de sódio 100 mM a 1,6 mM) preparada em placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi lido a uma absorbância a 540 nm (leitor de microplaca ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e por comparação com a linha de calibração padrão. Os resultados foram calculados através da representação gráfica da porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico versus concentração das amostras e expressos em relação à concentração do extrato etanólico que causa a inibição de 50% da produção de óxido nítrico - IC₅₀ (Silva *et al.*, 2020).

2.9. Atividade antibacteriana

2.9.1. Microrganismos e preparo do inóculo

As espécies bacterianas usadas na pesquisa foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 43893, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* New prov 0022, *Enterobacter cloacae* New prov 0083, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Bacillus cereus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi ATCC 19214, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais da Universidade Paranaense.

Para os ensaios, as células bacterianas foram cultivadas em meio de cultura ágar Muller-Hinton por 24 horas a 35 °C. A concentração do inóculo foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) em solução salina estéril (0,85%) e verificada em absorbância a 625 nm em espectrofotômetro (Spectra Max Plus). Posteriormente, a suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller-Hinton para obter densidade celular de $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, e o inóculo foi utilizado nos ensaios.

2.9.2. Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo frente ao extrato etanólico foi realizada por meio da técnica de microdiluição em série (CLSI, 2015) usando microplacas de 96 poços, modificada para produtos naturais. O extrato etanólico foi avaliado nas concentrações de 20 a 0,039 mg/mL dissolvidas em Tween 80 a 2 %, em um volume total de 100 µL da solução (meio de cultura e amostras). Após a diluição seriada, 50 µL do inóculo (padronizado conforme item 2.5.1) foi adicionado a cada poço e submetido à incubação por 35 °C por 24 h. A leitura foi realizada com a adição de 20 µL de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (Reatec®) a 1,0% em cada poço seguida de incubação das microplacas a 37° C por 20 min. A CIM foi definida como a menor concentração que resultou na inibição da multiplicação visual. O sorbato de potássio foi usado como controle de padrão comercial, dissolvidos em água destilada estéril e analisados nas concentrações de 100 a 0,39 mg/mL. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada pelo subcultivo de 10 µL de cada poço negativo e do controle positivo em ágar nutriente. As placas foram incubadas à 35 °C por 24 h e realizadas a leitura.

2.9.3. Avaliação antibacteriana da combinação de extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium* e sorbato de potássio

Para verificar o efeito da combinação, avaliou-se a combinação de 50% de sorbato de potássio e 50% de extrato etanólico de *A. millefolium*. Os ensaios foram realizados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia descrita no item 2.7.2. Com a combinação, o sorbato foi avaliado na concentração de 100 a 0,098 mg/mL e o extrato etanólico foi avaliado na concentração de 20 a 0,039 mg/mL. Para a diluição do extrato em água foram adicionadas 2% de tween 80.

As bactérias avaliadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 43893, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* New prov 0022, *Enterobacter cloacae* New prov 0083, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Bacillus cereus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella entérica* sorovar Typhi ATCC 19214, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Para avaliar a concentração bactericida da combinação entre as substâncias, também foi avaliado conforme a metodologia no item 2.7.2.

3. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) pelo programa SISVAR 4.3.

4. RESULTADOS

4.1. Composição química

Os resultados da composição química do extrato etanólico de *A. millefolium* por UHPLC-MS estão apresentados na Tabela 1. Foram identificados 16 compostos no extrato etanólico, sendo os majoritários ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido p-hiroxibenzoico, vanilina, rutina e ácido quínico (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-MS).

Composto	Média ug/g	Desvio Padrão	CV
Isovanilina	52,355	1,997	3,81
Hidroxibenzaldeído	34,013	1,047	3,08
Seringaldeído	16,190	0,503	3,10
Ácido Sinápico	16,976	1,235	7,28
Ácido clorogênico	>1300	138,495	2,27
Cumarina	9,373	0,812	8,67
Ácido nicotínico	29,520	0,205	0,70
Ácido Siringico	34,175	2,760	8,07
Cafeína	18,610	0,746	4,01
Ácido Protocatecuico	127,100	0,543	0,43
Ácido p-hiroxibenzoico	259,915	12,479	4,80
Vanilina	1210,254	55,949	4,62
Ácido p-cumarico	12,070	0,124	1,03
Ácido cafeico	8,522	0,886	10,40
Rutina	> 1300	96,225	1,94
Ácido quínico	> 1300	108,298	0,73

4.2. Fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante

O teor de fenóis foi de 61,56 mg para 1 mg/mL, 33,14 mg para 0,75 mg/mL, 15,87 mg para 0,50 mg/mL e 2,54 mg para 0,25 mg/mL, respectivamente.

O teor de flavonoides foi de 130,73 mg para 1 mg/mL, 151,02 mg para 0,75 mg/mL, 156,06 mg para 0,50 mg/mL e 182,60 mg para 0,25 mg/mL, respectivamente.

O extrato etanólico de *A. millefolium* mostrou potencial antioxidante pelo método DPPH, com IC₅₀ de 0,959 ± 0,001 mg/mL e o controle quercetina de 0,010 ± 0,001 mg/mL. Para o método FRAP, o extrato etanólico apresentou 1,35 µM Fe²⁺/mg de amostra e Trolox como padrão apresentou 9,175 ± 0.001 mg/mL.

Em relação ao método β-caroteno/ácido linoleico (Tabela 2), na concentração de 1,0 mg/mL, o extrato etanólico teve atividade de 55,17%, apenas 21,64% menor que o controle trolox (76,81%).

Tabela 2. Teor de fenóis totais (μg) equivalente de ácido gálico (EAG)/mg, teor de flavonoides totais equivalente de quercetina (EQ/mg) e atividade antioxidante (%) do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium* pelo sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico.

	Concentrações (mg/mL)			
	1,00	0,75	0,50	0,25
Fenóis totais	62,06 \pm 0,25 ^a	35,46 \pm 0,16 ^b	15,87 \pm 0,48 ^c	2,34 \pm 0,40 ^d
Flavonoides totais	130,73 \pm 2,19 ^a	151,02 \pm 11,21 ^{ab}	156,06 \pm 11,88 ^{ab}	182,60 \pm 20,49 ^b
Atividade antioxidante beta caroteno	55,17 \pm 6,99 ^a	54,49 \pm 5,38 ^a	50,30 \pm 7,93 ^a	43,32 \pm 7,25 ^a

Os valores são a média \pm desvio padrão do experimento realizado em triplicata. A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores na mesma coluna com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); Valores na mesma linha com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); Controle positivo: Trolox (0,2 mg/mL): 76,81 \pm 3,73.

Em relação à atividade antioxidante celular (Tabela 3), o extrato etanólico apresentou 76% de inibição, já a quercetina apresentou 96%, dessa forma o extrato etanólico apresentou 17% menor atividade antioxidante celular que quercetina.

Tabela 3. Atividade antioxidante celular do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% máxima de inibição
Extrato etanólico	2000	76%
Quercetina	2000	93%

Na atividade anti-inflamatória, o extrato etanólico apresentou ação inibidora da produção de óxido nítrico com 111 mg/mL. Em relação às células tumorais, apresentou IC₅₀ de 201 a 250 mg/mL, sendo inferior quando comparado ao controle elipticina, porém o extrato trata-se de uma mistura complexa de compostos, diferindo de quando se analisa uma substância padrão pura. Para células VERO, esses resultados são interessantes, pois mostra que não apresentou atividade antiproliferativa celular para célula não tumoral (Tabela 4), mostrando a possibilidade de aplicações para esse extrato.

Tabela 4. Inibição de óxido nítrico e antiproliferativa do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*.

	Extrato etanólico IC ⁵⁰ , mg/mL		Controles
Inibição de óxido nítrico (IC₅₀, µg/mL)			Dexametasona
RAW 246.7	111 ± 8,0		6,3 ± 0,4
Atividade antiproliferativa (GI₅₀, µg/mL)		Índice de Seletividade (IS)	Ellipticina
AGS	201 ± 4,0	1,61	1,23 ± 0,03
CaCo2	234 ± 8,0	1,38	1,21 ± 0,02
MCF-7	250 ± 12,0	1,29	1,02 ± 0,02
NCI-H460	248 ± 18,0	1,30	1,01 ± 0,01
Vero	324 ± 28,0	-	1,41 ± 0,06

4.3. Atividade antibacteriana

Os resultados da atividade antibacteriana para a concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração mínima bactericida (CBM) do extrato etanólico das folhas de *A. millefolium*, do controle sorbato de potássio e do sinergismo entre o extrato etanólico e sorbato de potássio para a concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração mínima bactericida (CBM) estão apresentados na tabela 5. Os resultados da CBM do extrato etanólico apresentaram resultados similares aos descritos para CIM, mostrando que ambos apresentam os mesmos valores para as respectivas bactérias.

Para *L. monocytogenes*, o valor de CIM e CBM do sorbato de potássio foi de >50,00 mg/mL para 10,00 mg/mL, mostrando que a ação em combinação contribuiu para uma redução na concentração.

Os valores de CIM e CBM mostram que a combinação dos compostos (extrato etanólico e sorbato de potássio) apresentou maior atividade antibacteriana para *E. coli* (1,25 mg/mL), *P. aeruginosa* (5,00 mg/mL) e *S. enterica* Typhi (10,00 mg/mL) quando comparado ao extrato etanólico isolado.

Quando analisado para o sorbato de potássio isolado, a maior atividade antibacteriana da combinação foi para *E. coli* (1,25 mg/mL), *P. aeruginosa* (5,00 mg/mL), *S. Typhi*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* ATCC 25923 (10,00 mg/mL). Esses resultados mostram a potencialidade, para utilização do sorbato de potássio em combinação aos compostos naturais, exceto *S. aureus*, pois manteve o valor de CIM.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima bactericida (CMB) do extrato etanólico das folhas de *Achillea millefolium*, controle positivo sorbato de potássio e sinergismo (extrato etanólico e sorbato de potássio).

Bactérias	Extrato Etanólico(mg/mL)	Sorbato de potássio (mg/mL)	Sinergismo (Extrato etanólico e sorbato de potássio)
	CIM CBM	CIM CBM	CIM CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,00 ± 0,00 ^a	50,00± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^a
	10,00 ± 0,00 ^a	50,00± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>40,00	50,00± 0,00 ^a	5,00 ± 0,00 ^a
	>40,00	50,00± 0,00 ^a	5,00 ± 0,00 ^a
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	20,00 ± 0,00 ^a	>50,00	-
	20,00 ± 0,00 ^a	>50,00	-
<i>Escherichia coli</i> New prov 0022	>40,00	6,25 ± 0,00 ^a	-
	>40,00	6,25 ± 0,00 ^a	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 12228	10,00 ±0,00 ^a	50,00± 0,00 ^b	-
	10,00 ±0,00 ^a	50,00± 0,00 ^b	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10,00 ± 0,00 ^a	>50,00	10,00 ± 0,00 ^a
	10,00 ± 0,00 ^a	>50,00	10,00 ± 0,00 ^a
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19214	40,00 ± 0,00 ^a	>50,00	10,00 ± 0,00 ^a
	40,00 ± 0,00 ^a	>50,00	10,00 ± 0,00 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2,50 ± 0,00 ^a	10,00± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b
	2,50 ± 0,00 ^a	10,00± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43893	40,00 ± 0,00 ^b	12,5 ± 0,00 ^b	-
	40,00 ± 0,00 ^b	12,5 ± 0,00 ^b	-
<i>Enterobacter cloacae</i> New prov 0083	>40,00	>50,00	-
	>40,00	>50,00	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20,00 ± 0,00 ^b	12,5 ± 0,00 ^b	1,25 ± 0,00 ^a
	20,00 ± 0,00 ^b	12,5 ± 0,00 ^b	1,25 ± 0,00 ^a

Os valores são a média ± desvio padrão do experimento realizado em triplicata. A análise estatística empregada foi análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey. Valores na mesma linha com diferentes letras são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificados 16 compostos no extrato etanólico das folhas de *A. millefolium*, sendo os majoritários ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido p-hiroxibenzoico, vanilina, rutina e ácido quínico, por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-MS) (Tabela 1). Até o momento, não foram encontrados estudos semelhantes sobre a composição química do extrato etanólico (96%) de *A. millefolium* pelo mesmo método de extração e identificação.

Gawel-Beben *et al.* (2020) identificaram compostos fenólicos como três isômeros do ácido cafeoilquínico (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA), cinarina, ácido quínico, flavonoides como quercetina e jaceidina, além de derivados de ácidos fenólicos, em extratos hidroglicólicos das flores de *Achillea millefolium*. Por outro lado, Dolwitsch *et al.* (2016) relataram ácido cafeico, quercetina, canferol e flavona em extrato etanólico (10%) das folhas de *A. millefolium*. Essas diferenças refletem como a composição química de extratos de *A. millefolium* é influenciada por variáveis como o tipo de solvente, a parte da planta analisada e o método de extração.

Na avaliação da atividade antioxidante, o presente estudo destacou o potencial do extrato etanólico nos métodos DPPH e FRAP, embora com valores inferiores aos padrões utilizados. Estudos anteriores corroboram a importância do solvente e da metodologia analítica na determinação da capacidade antioxidante. Adil *et al.* (2024) demonstraram que os extratos metanólico e clorofórmico de *A. millefolium* apresentaram alta atividade antioxidante pelo método DPPH, com 84,21% e 78,94% de inibição, respectivamente, a 300 mg/mL após 90 minutos, sendo o extrato metanólico mais eficaz, mas ainda inferior ao padrão ácido ascórbico (88,72%). No presente trabalho a concentração que inibiu 50% pelo DPPH foi de IC₅₀ de 0,959 ± 0,001 mg/mL.

Em contrapartida, o método β-caroteno/ácido linoleico, indicou que o extrato etanólico do presente estudo pode ser considerado com atividade antioxidante intermediária, com inibição entre 40% e 70%, segundo os critérios de Hassimotto, Genovese e Lajolo (2005). Esses resultados destacam a necessidade de diferentes métodos para uma avaliação mais abrangente das propriedades antioxidantes.

O teor de fenóis presentes no extrato etanólico de *A. millefolium* foi de 61,56 mg para 1 mg/mL, 33,14 mg para 0,75 mg/mL, 15,87 mg para 0,50 mg/mL e 2,54 mg para 0,25 mg/mL, respectivamente. Já o teor de flavonoides totais foi de 130,73 mg para 1 mg/mL, 151,02 mg para 0,75 mg/mL, 156,06 mg para 0,50 mg/mL e 182,60 mg para 0,25 mg/mL, respectivamente. Flavonas como luteolina-7-O-glucosídeo e luteolina, compostos fenólicos predominantes na

fração precipitada de *A. millefolium*, são descritas como potentes agentes antioxidantes. Não apenas compostos fenólicos, mas também o extrato de *A. millefolium*, as frações separadas e alguns óleos essenciais estão envolvidos em sua capacidade anti-inflamatória (Villalva *et al.* 2022). A luteolina foi um dos flavonoides encontrados nas folhas, composto bioativo que possui ação antioxidante. Devido a essa ação, esses compostos protegem as células contra os efeitos danosos dos radicais livres. O uso frequente de preparações e alimentos ricos nessas substâncias pode, portanto, ser benéfico à saúde uma vez que elas são capazes de neutralizar os radicais livres e prevenir várias doenças (CEPLAMT, 2016).

Em relação à atividade antibacteriana, o extrato etanólico apresentou CIM de 10,00 mg/mL contra *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes*, *S. Typhi* e *S. aureus* ATCC 29213. Esses resultados são consistentes com Grigore *et al.* (2020), que relataram atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *A. millefolium* contendo flavonoides expressos como rutina, ácidos polifenólicos carboxílicos, como ácido cafeico, saponinas triterpênicas (determinados espectrofotometricamente), contra *S. aureus* ATCC 25923.

De maneira semelhante, Rasha (2011) relatou que o extrato alcoólico e aquoso de flores de mil-folhas demonstrou um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo avaliado por meio do teste de difusão em disco de Kirby-Bauer contra diversos microrganismos em diferentes concentrações. O extrato alcoólico apresentou o maior efeito inibidor, com zonas de inibição de 30 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* e 24 mm contra *Staphylococcus aureus*, superando o antibiótico padrão ciprofloxacina (5 µg/ml), que exibiu zonas de 26 mm e 22 mm, respectivamente. Além disso, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato alcoólico para os microrganismos sensíveis foram: 50 mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* e 100 mg/ml para *Staphylococcus aureus*.

Segundo Villalva *et al.* (2022) o extrato de *A. millefolium* e suas frações demonstraram eficácia na inibição do crescimento de *Helicobacter pylori*, sendo que as frações separadas tiveram uma contribuição mais significativa para a atividade antibacteriana dos extratos. Especificamente na *A. millefolium*, os principais compostos voláteis identificados, como cânfora, borneol e cetona de artemísia, também se mostraram eficazes na inibição do crescimento dessa bactéria. Embora a resposta bioativa possa variar conforme a cepa de *H. pylori*, este estudo confirmou que *A. millefolium* e suas frações atuam como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e antibacterianos, independentemente das características da cepa utilizada.

Conforme relatado por Yildirim *et al.* (2023), *A. millefolium* demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella typhimurium* ATCC 25241 e *Escherichia coli* ATCC 11775. O estudo avaliou essas seis cepas bacterianas por meio do método de difusão em disco, empregando discos de papel filtro de 6 mm.

Adil *et al.* (2024) identificaram compostos como apigenina, ácido cafeico, quercetina e rutina, os quais podem contribuir significativamente para a ação antibacteriana de *A. millefolium*. De acordo com Magnani *et al.* 2014, o ácido cafeico apresenta forte atividade antioxidante, aumento na produção de colágeno e na prevenção do envelhecimento precoce, também apresenta atividade antimicrobiana, tornando-o uma substância adequada e promissora no tratamento de doenças de pele.

Yi *et al.* (2024) avaliou a atividade antimicrobiana da rutina, que teve ação contra *E. coli* ATCC 25922. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) foi de 0,125, respectivamente. A apigenina, juntamente com a quercetina, rutina e outros flavonoides, tem sido associada a efeitos antivirais. Sua atividade antiviral parece estar ligada a compostos não glicosídicos, sendo a hidroxilação na posição 3 um possível requisito para essa ação. Além disso, a apigenina também demonstrou propriedades anti-inflamatórias (Salehi *et al.*, 2019).

Embora o sorbato de potássio seja amplamente utilizado como conservante devido à sua eficácia contra bactérias, fungos e bolores, seu uso excessivo pode causar efeitos adversos à saúde, como alergias e dificuldades na absorção de nutrientes (Metachem, 2023). Estudos consideraram que o nível sem efeito adverso observado de 300 mg de ácido sórbico/kg de peso corporal/dia, obtido a partir de um estudo de toxicidade reprodutiva em duas gerações de ratos, pode ser usado para definir uma IDA (Ingestão Diária Aceitável) grupal temporária para o sorbato de potássio. Observou-se que a estimativa de exposição ao sorbato de potássio excedeu a ingestão diária aceitável temporária de 3 mg/kg de peso corporal/dia para todos os grupos populacionais, tanto em níveis médios quanto elevados (EFSA, 2015).

Estudos mostraram que o sorbato de potássio, em altas concentrações ou em combinação com nitrito, apresenta um efeito genotóxico *in vitro* (Carocho *et al.*, 2014). Além disso, pesquisas adicionais indicaram que o sorbato de potássio puro pode causar irritação na pele, nos olhos e no sistema respiratório (Magomya *et al.*, 2020). Adwan *et al.* 2010 avaliou a possível interação *in vitro* entre o extrato etanólico das sementes de *Rhus coriaria* e

medicamentos antimicrobianos conhecidos, incluindo cloridrato de oxitetraciclina, penicilina G, cefalexina, sulfadimetoxina sódica e enrofloxacina. Os resultados deste estudo indicaram uma redução na concentração inibitória mínima e uma potente atividade bactericida contra três cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

Com isso, o uso de combinações de compostos antimicrobianos pode potencializar a atividade de conservação, ou reduzir a concentração inibitória mínima. Nesse contexto, o extrato de *A. millefolium* surge como uma alternativa natural promissora, unindo propriedades antibacterianas e antioxidantes que podem ser exploradas na conservação de alimentos.

Os resultados deste estudo reforçam o potencial de *A. millefolium* como fonte de compostos bioativos com aplicações tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica. Além de consolidar sua eficácia antioxidante e antibacteriana, os achados ressaltam a importância de investigar mais detalhadamente os métodos de extração e as condições de uso para maximizar a eficácia dos compostos bioativos da planta em diferentes contextos industriais.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que a *Achillea millefolium* apresenta propriedades antioxidantes, ação inibidora da produção de óxido nítrico, atividade antiproliferativa, antibacteriana e eficácia em sinergia com o sorbato de potássio promissoras, com potencial para substituir ou complementar conservantes sintéticos na indústria farmacêutica e alimentícia. A continuidade das investigações, especialmente sobre os mecanismos de sinergismo e os efeitos em sistemas complexos, pode consolidar seu uso industrial.

A caracterização por UHPLC-MS revelou a presença de 16 compostos bioativos, sendo os majoritários: Ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido p-hiroxibenzoico, vanilina, rutina e ácido quínico. Apesar do desempenho antioxidante inferior aos padrões quercetina e trolox em alguns métodos, a elevada atividade antioxidante celular destacam seu potencial. A atividade antibacteriana demonstrou eficácia notável da combinação do extrato etanólico e sorbato de potássio, para os patógenos alimentares. Esses achados sugerem que o extrato de *A. millefolium* pode atuar como um conservante natural eficaz, com aplicações potenciais tanto de forma isolada quanto em combinação com conservantes sintéticos. Estudos futuros são necessários para aprofundar os mecanismos de ação e validar sua eficácia em matrizes alimentares complexas.

7. AGRADECIMENTOS

A autora agradece a CAPES, a UNIPAR e ao CNPq pelas bolsas e financiamento de pesquisa.

8. REFERÊNCIAS

ADIL, M. *et al.* HPLC analysis, genotoxic and antioxidant potential of *Achillea millefolium* L. and *Chaerophyllum villosum* Wall ex. Dc. **Springer Nature Link**, v. 24, n. 91, 2024.

ADWAN, G. *et al.* Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 266-269, 2010.

ALBARICI, T. R.; FREITAS, D. M.; PESSOA, J. D. C. **Protocolos de Análises para Polpa de Açaí: um guia prático de consulta**. 1. ed., v. 1, p 48, 2009.

ALI, S. I.; GOPALAKRISHNAN, B.; VENKATESALU, V. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: A review. **Phytotherapy Research**, p. 1140-1161, 2017.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 37-41, 2013.

ASLANTURK OS, CELIK TA. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant *Euphorbia platyphyllos* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 19, p. 293-304, 2013.

AZEVEDO, B.M.; LEONARDI, J.G. Métodos de Conservação de Alimentos. **Revista Saúde em Foco**, n. 10, p. 51-61, 2018.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v.17, p. 3989-4006, 2012.

BETINA, A. S. Aditivos alimentares: Aspectos Tecnológicos e impactos na Saúde Humana. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 7-8, 2019.

CANDAN, F. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (*Asteraceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, Pretoria, v. 87, p.215-20, 2003.

CAROCHO, M. *et al.* Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2014.

CEPLAMT (Centro Especializado em Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas). **UFMG**, 2016.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial

Susceptibility Tests. Approved Standard M07-A10. **CLSI**, 2015.

DAMIÃO, V. H. B. *et al.* Diferentes métodos de extração para obtenção de metabólitos em planta jovem nim (*Azadirachta indica*) por cromatografia líquida de alta eficiência. **OBSERVATÓRIO DA ECONOMIA LATINOAMERICANA**, v. 22, p. 4372-4386, 2024.

DE BARROS, J. R. *et al.* Conservação de alimentos pelo uso de aditivos: Uma Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

DOLWITSCH, B. *et al.* Atividade antioxidante (ROO·, O₂- e DPPH) e compostos fenólicos majoritários para folha, flor, ramo e inflorescência da *Achillea millefolium*. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 3, p. 1487-1495, 2016.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. **EFSA Journal**, p. 3-4, 2015. doi:10.2903/j.efsa.2015.4144

FAIKU, F. *et al.* In vitro antibacterial activity of different solvent extracts of *Achillea millefolium* (L.) growing wild in Kosovo. **Fresenius Environmental**. Bulletin. p. 3878-3883, 2018.

FERREIRA, M. J. G. *et al.* Antimicrobial activity and chemical characterization of the bark decoction of cumaru stem. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.50, n.3, 2020.

GALVÃO, E. L. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of lin seed oil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 551-557, 2008.

GAWEL-BĘBEN, K. *et al.* *Achillea millefolium* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. Hydroglycolic Extracts–Bioactive Ingredients for Cosmetic Use. **Molecules**, 2020.

GRIGORE, A. *et al.* Antimicrobial Activity of an *Achillea millefolium* L. **Proceedings**, 2020.

GOTTSCHALD, M. Sorbato de potássio faz mal? Para que serve? **Mundo Boa Forma**, v. 1, 2023.

HASSON, R. N. Antibacterial Activity of Water and Alcoholic Crude Extract of Flower *Achillea millefolium*. **Rafidain Journal of Science**. v. 22, n. 3, p. 5, 2011.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

KULISIC, T.; RADANIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

LOPES, F. C. M. *et al.* Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. (“milfolhas”). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13 supl 2, p.11-13, 2003.

LOPES, F. C. M. *et al.* Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor- α in murine macrophages. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 401-405, 2005.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. p. 129, 2002.

MAGNANI, C. *et al.* Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, p. 3203-3210, 2014.

MAGOMYA, A. M. *et al.* Analysis of Potassium Bromate in Bread and Flour Samples Sold in Jalingo Metropolis, Northern Nigeria. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, 2020.

METACHEM. Sorbato de Potássio: o que é e para que serve o conservante alimentício para indústria? **Metachem**, v. 1, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). **OMS**, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. v. 1, p. 18, 2023.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, p. 211-219, 2004.

RORIZ, C. L. *et al.* Chemical and bioactive features of *Amaranthus caudatus* L. flowers and optimized ultrasound-assisted extraction of betalains. **Foods**, v. 10, p. 779, 2021.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no Sistema B-caroteno/Ácido Linoléico. Fortaleza: **EMBRAPA**. p. 4, 2006a.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: **EMBRAPA**. p. 4, 2006b.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: **Embrapa**, Comunicado Técnico, v. 127, p. 1-4, 2007.

SABAHI, Z.; SOLTANI, F.; MOEIN, M. Insight into DNA protection ability of medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 8, n. 2, p. 120, 2018.

SALEHI, B. *et al.* The Therapeutic Potential of Apigenin. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

SHAHIDI, F.; JOHN, J. A. Oxidative rancidity in nuts. In: Improving the safety and quality of

nuts. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**. p. 198-229, 2013.

SHAMEELA S.; MALLAIAH, P.; SREENIVASULU, N.; DEVI, K.L. Studies on Antigenotoxic and In-vitro Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* L. (*Nyctaginaceae*). **International Journal of Research and Analytical Reviews**, 2018.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 7 ed. São Paulo: Varela, 2014.

SILVA, A.R.; PINELA, J.; DIAS, M.I.; CALHELHA, R.C.; ALVES, M.J.; MOCAN, A.; GARCÍA, P.A.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Exploring the phytochemical profile of *Cytinus hypocistis* (L.) L. as a source of health-promoting biomolecules behind its in vitro bioactive and enzyme inhibitory properties. **Food and Chemical Toxicology**, 2020

SOUSA DE SÁ, P. G. *et al.* Total phenols, total flavonoids and antioxidant activity of *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (*Selaginellaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SRIVIDYA, A. R.; DHANABAL, S. P.; SATHISH KUMAR, M. N.; VISHNUVARTHAN, V. J. Genotoxic activities of hydro alcoholic extract of *Curcuma aromatica Salisb*, *Curcuma zedoaria* and *Curcumin* by chromosomal aberration test. **International Journal of Biotechnology**, 2013.

TRIPON, R. *et al.* Phytochemical, antioxidant and antibacterial profile of *Achillea millefolium* L.: a literature review. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**. v. 28, p. 340-348, 2024.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. **Chemico-Biological Interaction**. v. 160, p. 1-40, 2006.

VILLALVA, M. *et al.* *Achillea millefolium* L. Extract and Its Fractions Obtained by Supercritical Anti-Solvent Fractionation against *Helicobacter pylori*. **Antioxidants**, 2022.

WARAHO, T.; CARDENIA, V.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in emulsified food products. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, 2011.

WOLFE, K.L., Liu, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55(22), 8896-8907. 2007 <https://doi.org/10.1021/jf0715166>.

YI, L. *et al.* Synergistic effects and mechanisms of action of rutin with conventional antibiotics against *Escherichia coli*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024.

Yildirim, B., Ekici, K., & Kocak, M. Z. Essential oil composition of yarrow species (*Achillea millefolium* L. and *Achillea wilhelmsii*): antioxidant and antibacterial activities of essential oils. **Stud. Univ. Babeş - Bolyai, Chem**, 2023.