

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos visando a determinação quantitativa do marcador químico verbascosídeo em *Plantago australis* Lam. e *Plantago major* L. (Plantaginaceae)

MARIA HELENA VENDRUSCOLO

Porto Alegre, 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos visando a determinação quantitativa do marcador químico verbascosídeo em *Plantago australis* Lam. e *Plantago major* L. (Plantaginaceae)

Tese apresentada por Maria Helena Vendruscolo para obtenção de TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Amélia T. Henriques  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.12.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr<sup>a</sup> Gabriela de Carvalho Meirelles  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>o</sup> Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup> Renata Biegelmeyer  
Universidade Federal da Bahia

Vendruscolo, Maria Helena  
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos  
visando a determinação quantitativa do marcador  
químico verbascosídeo em *Plantago australis* Lam. e  
*Plantago major* L. (Plantaginaceae) / Maria Helena  
Vendruscolo. -- 2021.  
184 f.  
Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Coorientadora: Gilsane Lino von Poser.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. *Plantago major* L.. 2. *Plantago australis* Lam. 3.  
Verbascosídeo. 4. Desenvolvimento de métodos  
cromatográficos. 5. Validação de método quantitativo.  
I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Lino von  
Poser, Gilsane, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder força, coragem, amor e determinação para concretizar meus sonhos e objetivos de vida.

A Professora Gilsane, carinhosamente “Gil”, por ter me inserido na área da pesquisa como estagiária, mestranda e posteriormente por ser minha co-orientadora de doutorado. Agradeço por toda a disponibilidade e disposição em compartilhar seu conhecimento em todas as etapas da pesquisa. Obrigada por ser sempre a voz da razão!

A Professora Amélia pela confiança, orientação e apoio. Ser orientada por uma pesquisadora tão respeitada na nossa área, que orientou os professores que tanto admiro, é um grande privilégio. Serei sempre grata por ter sido sua orientada.

A Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me receber e apoiar a minha participação no doutorado.

Aos colegas de laboratório por compartilharem experiências e conhecimento durante esse período. Obrigada Henrique Bridi, Angélica Vestena, Bianca Elingson, Kriptsan Diel, Gabriela Meirelles, Elen Oliveira, Juliana Andrade, Maíra de Souza, Prof. Miriam Apel, Prof. Sérgio Bordignon e Prof. Dr. José Ângelo.

A minha querida amiga e colega Mariana Koetz por ser a minha pessoa. Não poderia imaginar, a seis anos atrás, que aquela colega que eu derrubei acidentalmente todos os balões do experimento se tornaria uma amiga e uma parceira de laboratório extraordinária. Durante todos esses anos, e com uma pandemia no meio do caminho, você amiga, juntamente com o Pedro, se tornaram minha rede de apoio, me aconselhando de maneira imparcial e racional sobre as diversidades da vida acadêmica, profissional e pessoal. Muito obrigada por compartilhar teu conhecimento e por contribuir de maneira tão generosa para que o meu trabalho se concretizasse.

A meus queridos pais, Matheus e Maria de Lourdes, agradeço por sempre ter me mostrado a importância do estudo, que tudo pode nos ser tirado, menos o conhecimento. Agradeço a minha mãe por sempre acreditar na minha capacidade, me

apoiar, me dar força, incentivar e possibilitar que meu sonho se concretizasse. Obrigada pelo seu amor incondicional e ser a melhor parte de mim.

Aos meus irmãos (Márcio e Marcelo), cunhadas (Giana e Renata) e sobrinhos (Juliara, Matheus, Joana e Eduardo) por todo o carinho e compreensão.

Aos pais do meu esposo, Pedro e Ivone, pelo carinho, compreensão e apoio.

Ao meu esposo Pedro pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos. Sempre acreditou em mim, me incentivando e apoiando desde a graduação até o doutorado. Sem teu amor, amizade e companheirismo esta jornada teria sido mais difícil. Obrigada por ter feito parte da concretização deste sonho e trabalho. Essa conquista é nossa!

## RESUMO

As espécies *Plantago australis* Lam. e *Plantago major* L., conhecidas popularmente como tansagem, têm sido empregadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios, antibacterianos e cicatrizantes, entre outros. Várias destas atividades foram objeto de ensaios farmacológicos. Assim, este estudo tem como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos de acordo com a RDC nº 166/2017, identificando marcadores químicos para estabelecer os critérios mínimos de qualidade para o uso de extratos das folhas de *P. australis* (PA) e *P. major* (PM) (Plantaginaceae). Por análises cromatográficas prévias e dados da literatura foi determinado como marcador químico para ambas as espécies o feniletanoide verbascosídeo. Os resultados do desenvolvimento do método extrativo para análise de verbascosídeo de PA e PM demonstraram que o melhor método de extração foi o refluxo e o metanol como melhor solvente extrator. A otimização de extração dessas espécies por CLUE/UV foi realizada por Desenho Fatorial Fracionado, seguido de planejamento via Desenho de Composto Central para PA e planejamento via Box-Behnken para PM. Para folhas de PA a melhor resposta obtida foi quando da utilização de material cominuído com tamanho de partículas de 180 µm, 20 min de extração, relação massa: volume (m/v) de 1:62,5, metanol 66% e sem renovação de solvente. Para PM a melhor resposta foi obtida com o mesmo tamanho de partículas, porém com tempo de extração de 60 min, relação massa: volume (m/v) de 1:60, metanol 89% e sem renovação de solvente. A determinação de perda por dessecação mostrou os teores de umidade nas folhas de PA foram de 6,99 a 9,37% e de PM foram de 6,9 a 8,81%. Os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das amostras de PA e PM obtidos por CCDAE mostram o marcador químico verbascosídeo com Rf médio de 0,77. Os parâmetros da validação do método de quantificação de verbascosídeo para PA e PM demonstraram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e adequabilidade do sistema satisfatório.

**Palavras-chave:** *Plantago australis*, *Plantago major*, verbascosídeo, CLAE, CLUE, otimização, validação, método analítico.



## ABSTRACT

The species *Plantago australis* Lam. and *Plantago major* L., popularly known as tansagem, have been used in folk medicine as anti-inflammatory, antibacterial and healing agents, among others. Several of these activities were the subject of pharmacological tests. Thus, this study aims to develop and validate analytical methods in accordance with RDC n° 166/2017, identifying chemical markers to establish the minimum quality criteria for the use of extracts from the leaves of *P. australis* (PA) and *P. major* (PM) (Plantaginaceae). By previous chromatographic analyzes and literature data, the phenylethanoid verbascoside was determined as a chemical marker for both species. The results of the development of the extractive method for the analysis of verbascoside from PA and PM showed that the best extraction method was reflux and methanol as the best extracting solvent. The extraction optimization of these species by UPLC/UV was performed by Fractional Factorial Design, followed by planning via Central Composite Design for PA and planning via Box-Behnken for PM. For PA sheets, the best response was when using comminuted material with a particle size of 180  $\mu\text{m}$ , 20 min of extraction, mass: volume (m/v) ratio of 1:62.5, methanol 66% and no renewal of solvent. For PM, the best response was obtained with the same particle size, but with an extraction time of 60 min, mass: volume (m/v) ratio of 1:60, methanol 89% and no solvent renewal. The determination of loss by desiccation showed the moisture contents in the PA leaves were from 6.99 to 9.37% and of PM were from 6.9 to 8.81%. The chromatographic profiles of the methanolic extracts of the PA and PM samples obtained by HPTLC show the chemical marker verbascoside with an average  $R_f$  of 0.77. The parameters of the validation of the verbascoside quantification method for PA and PM demonstrated selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness and suitability of the satisfactory system.

**Keywords:** *Plantago australis*, *Plantago major*, verbascoside, HPLC, UPLC, optimization, validation, analytical method.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1: Espécies do gênero <i>Plantago</i> : <i>Plantago australis</i> Lam; <i>Plantago lanceolata</i> L.; <i>Plantago major</i> L. ....	34
Figura 3-2: <i>Plantago australis</i> Lam.....	35
Figura 3-3: <i>Plantago major</i> L.....	37
Figura 3-4: FEGs com substituintes em C-3' (R2) da glicose.....	51
Figura 3-5: FEGs com substituintes em C-2' (R1), C-4' (R3) e C-6' (R4) da glicose.....	51
Figura 3-6: FEGs de <i>Remannia glutinosa</i> (Scrophulariaceae). (a) jionosídeo A; (b) jionosídeo B; (c) jionosídeo C; (d) cistanosídeo F; (e) verbascosídeo .....	52
Figura 3-7: FEG com atividade neuroprotetora, osmantusídeo B .....	53
Figura 3-8: FEGs de <i>Scrophularia scorodonia</i> com atividade anti-inflamatória .....	53
Figura 3-9: Verbascosídeo .....	54
Figura 3-10: Via biosintética do verbascosídeo.....	56
Figura 3-11: Sugestão de via de fragmentação para verbascosídeo .....	57
Figura 4-1: Cromatograma da aucubina isolada do extrato etanólico de <i>P. australis</i> detectado em 210 nm.....	70
Figura 4-2: Cromatograma do verbascosídeo isolada do extrato metanólico de <i>P. australis</i> detectado em 332 nm. ....	70
Figura 4-3: Aucubina. ....	71
Figura 3-9: Verbascosídeo. ....	72
Figura 4-4: (a) Cromatograma e espectro de massas do verbascosídeo; (b) proposta de fragmentação para o verbascosídeo. ....	74
Figura 4-5: Cromatogramas obtidos para o método desenvolvido por CLUE. (a) solução SQR; (b) amostra PA-01; (c) amostra PM-01 detectado em 332 nm.....	75
Figura 4-6: Comparativo dos perfis cromatográficos entre as amostras da espécie de PA detectado em 332 nm.....	77
Figura 4-7: Comparativo dos perfis cromatográficos entre as amostras da espécie de PM detectado em 332 nm. ....	77
Figura 4-8: Comparativo dos picos dos cromatogramas e espectros UV adquiridos por UHPLC detectados em 332 nm. (a) amostra de PM; (b) amostra de PA. ....	79
Figura 4-9: (a) Cromatoplaça obtida para os perfis cromatográficos da CRS VB e das amostras PA-01 a PA-07 e PM-01 a PM-07; (b) densitograma da CRS VB e das	

amostras de PA e PM; (c) espectro UV: 1: azul, CRS no Rf 0,77; (d) espectro UV: 2: azul, feniletanoide identificado nas amostras de PA; (e) espectro UV: 3: laranja, flavonoide identificado nas amostras de PM com Rf 0,55. ....	80
Figura 5-1: Gráfico de Pareto de PA-01 gerado no <i>software</i> a partir dos resultados do DFF.....	95
Figura 5-2: Gráfico dos efeitos individuais dos fatores analisados no DFF de PA-01. ....	96
Figura 5-3: Gráficos dos efeitos das interações dos fatores analisados no DFF de PA-01.....	96
Figura 5-4: Gráfico de Pareto gerado no <i>software</i> a partir dos resultados do DFF de PM-01. ....	97
Figura 5-5: Gráfico dos efeitos individuais dos fatores analisados no DFF de PM-01. ....	98
Figura 5-6: Gráficos dos efeitos das interações dos fatores analisados no DFF de PM-01.....	98
Figura 5-7: Gráfico de Superfície de Resposta que demonstram a influência dos fatores de PA-01.....	100
Figura 5-8: Gráficos de Superfície de Resposta que demonstram a influência dos fatores: volume de metanol (mL); metanol (%) e tempo (min). ....	103
Figura 5-9: Comparativo de Espectros UV. (a) SQR; (b) PA-01; (c) PA-01+SQR; (d) PM-01; (e) PM-01+SQR; (f) branco (metanol) – CLUE detectado em 332 nm. ....	106
Figura 5-10: Cromatograma da pureza do pico: (a) SQR; (b) PA-01 e (c) PM-01 detectado em 332 nm. ....	107
Figura 5-11: Gráfico de dispersão das curvas de padrão VB obtida da linearidade dia 1, 2 e 3, equação da reta e coeficiente de regressão – CLUE. ....	108
Figura 5-12: Gráfico da análise dos resíduos do estudo da linearidade. ....	110
Figura 5-13: Gráfico de dispersão das curvas obtidas.....	111
Figura 5-14: Gráfico dos efeitos produzidos pela variação dos parâmetros: (a) PA-01; (b) PM-01.....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1: Ensaios pré-clínicos – ensaios toxicológicos e farmacológicos descritos na literatura com <i>P. major</i> L. ....	40
Tabela 4-2: Plantas medicinais utilizadas no trabalho e locais de coletas. ....	62
Tabela 4-3: Parâmetros e método definidos para análise por CLAE.....	66
Tabela 4-4: Parâmetros e método definidos para análise por CLUE. ....	67
Tabela 4-5: Parâmetros desenvolvidos para análise por CCDAE.....	68
Tabela 4-6: Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O) de aucubina.....	72
Tabela 4-7: Dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O) de verbascosídeo. ....	73
Tabela 4-8: Resultados da determinação de água para a amostra de PA-01 a PA-07. ....	81
Tabela 4-9: Resultados da determinação de água para a amostra de PM-01 a PM-07. ....	82
Tabela 5-1: Parâmetros utilizados na escolha do método e solvente extrator para as amostras de PA-01 e PM-01. ....	86
Tabela 5-2: Desenho Fatorial Fracionado 25-1 avaliando quatro fatores para PA-01 e PM-01.....	87
Tabela 5-3: Desenho do Composto Central avaliando dois fatores de PA-01 .....	88
Tabela 5-4: Resposta obtida para cada experimento realizado no DBB de PM-01...88	
Tabela 5-5: Parâmetros avaliados no Experimento de Youden. ....	91
Tabela 5-6: Resultados obtidos com diferentes métodos e solventes na extração das amostras de PA.....	93
Tabela 5-7: Resposta obtida para cada experimento realizado no DFF de PA-01 e PM-01 .....	94
Tabela 5-8: Desenho do Composto Central avaliando dois fatores de PA-01 .....	99
Tabela 5-9: Parâmetros otimizados para extração de VB na amostra de PA-01. ...	100
Tabela 5-10: Resultados obtidos na otimização da extração do DCC de PA-01.....	101
Tabela 5-11: Resposta obtida para cada experimento realizado no DBB de PM-01. ....	101
Tabela 5-12: Parâmetros fixados para extração de VB na amostra de PM-01. ....	103
Tabela 5-13: Resultados obtidos na verificação da extração do DBB de PM-01. ...	104

Tabela 5-14: Resultados obtidos a partir das áreas da linearidade dias 1, 2 e 3 – CLUE. .....	108
Tabela 5-15: Resultados de precisão do método por CLUE de PA-01.....	112
Tabela 5-16: Resultados de precisão do método por CLUE de PM-01. ....	112
Tabela 5-17: Resultados obtidos no teste de recuperação (exatidão) – CLUE. ....	113
Tabela 5-18: Resultados obtidos no experimento de Youden na etapa de robustez. .....	113
Tabela 5-19: Resultados obtidos do experimento de Youden considerando $p$ -valor. .....	114
Tabela 5-20: Resultados da adequabilidade do sistema – CLUE.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

2D – Duas Dimensões

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCDAE – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

CLAE/UV – Cromatografia Líquida de Alta com Detecção por Ultravioleta

CLUE/UV – Cromatografia Líquida de Ultra com Detecção por Ultravioleta

CV – Coeficiente de variação

DBB – Desenho Box-Behnken

DCC – Desenho de Composto Central

DFF – Desenho Fatorial Fracionado

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FEG – Feniletanoides glicosídicos

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HPTLC – High Performace Thin Layer Chromatography

ICN – Instituto de Ciências Naturais

LD – Limite de Detecção

LPS – Lipopolissacarídeo

LQ – Limite de Quantificação

ME – Margem de Erro

MSR – Metodologia de Superfície de Resposta

MTT – Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NO – Óxido Nítrico

NRU – Neutral Red Uptake

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – *Plantago australis* Lam.

PM – *Plantago major* L.

PEG – Polietilenoglicol

REA – Relação Estrutura Atividade

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RN – Reagente Natural

SQR – Substância Química de Referência

SQT – Solução Química de Trabalho

SR – Solução de Referência

SUS – Sistema Único de Saúde

TFA – Trifluoroacetic acid

TLC – Thin Layer Chromatography

T<sub>R</sub> – Tempo de Retenção

UPLC – Ultra Performace Liquid Chromatography

UPLC –Ultra Performance Liquid Chromatography

UV – Ultravioleta

VB – Verbascosídeo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	31
3.1. FAMÍLIA PLANTAGINACEAE .....	33
3.2. GÊNERO <i>Plantago</i> .....	34
3.2.1. <i>Plantago australis</i> Lam. ....	35
3.2.2. <i>Plantago major</i> L. ....	37
3.2.3 Feniletanoides glicosídicos .....	50
3.2.3.1. Verbascosídeo .....	54
4. CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE <i>Plantago australis</i> E <i>Plantago major</i> , E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	59
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....	62
4.1.1. Material vegetal .....	62
4.1.2. Solventes, reagentes, equipamentos e acessórios .....	62
4.1.3. Extração, isolamento e identificação .....	63
4.1.4. Desenvolvimento de métodos para otimização da extração e quantificação das amostras e perfil cromatográfico .....	66
4.1.4.1. CLAE/UV .....	66
4.1.4.2. CLUE/UV .....	67
4.1.5. Perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada de alta eficiência – CCDAE .....	67
4.1.6. Métodos de análise de drogas vegetais .....	68
4.1.6.1. Determinação de Água em Drogas Vegetais .....	68
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4.2.1. Extração, isolamento e identificação .....	69

4.2.2. Desenvolvimento de métodos para otimização da extração e quantificação das amostras e perfil cromatográfico.....	75
4.2.3. Perfil Cromatográfico por cromatografia em camada delgada de alta eficiência – CCDAE .....	79
4.2.4. Método de análise de drogas vegetais.....	81
4.2.4.1. Determinação de água em drogas vegetais.....	81
5. CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE).....	83
5.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	86
5.1.1. Escolha do método e solvente extrator .....	86
5.1.2. Desenho experimental e análise estatística.....	87
5.1.2.1. Desenho Fatorial Fracionado (DFF) .....	87
5.1.2.2. Planejamento via Desenho Composto Central (CCD) .....	87
5.1.2.3. Planejamento via Desenho Box-Behnken (DBB).....	88
5.1.3. Validação do método quantitativo .....	89
5.1.3.2. Linearidade.....	89
5.1.3.3. Efeito Matriz.....	89
5.1.3.4. Repetibilidade (Intra-dia) e Precisão Intermediária (Inter-dia) .....	90
5.1.3.5. Exatidão.....	90
5.1.3.6. Robustez .....	90
5.1.3.7. Adequabilidade do sistema.....	91
5.1.3.8. Teor das amostras.....	92
5.1.3.9. Análise estatística.....	92
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.2.1. Escolha do método e solvente extrator .....	92
5.2.2. Desenho experimental e análise estatística .....	94
5.2.2.1. Desenho Fatorial Fracionado (DFF) .....	94

5.2.2.2.	Planejamento via Desenho Composto Central (CCD) .....	98
5.2.2.3.	Planejamento via Desenho Box-Behnken (DBB) .....	101
5.2.3.	Validação do método quantitativo .....	104
5.2.3.1.	Seletividade.....	104
5.2.3.2.	Linearidade .....	108
5.2.3.3.	Limites de detecção e Limite de Quantificação.....	110
5.2.3.4.	Efeito matriz .....	110
5.2.3.5.	Repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia).....	111
5.2.3.6.	Exatidão .....	112
5.2.3.7.	Robustez.....	113
5.2.3.8.	Adequabilidade do sistema .....	115
5.2.3.9.	Teor das Amostras.....	117
6.	REFERÊNCIAS.....	117
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	137
8.	ANEXO 1 – ARTIGO – HERBAL PRODUCTS OF <i>Plantago</i> SPECIES: INTERNATIONAL PATENTS SURVEY .....	141
9.	ANEXO 2 – DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE AUCUBINA E VERBASCOSÍDEO ISOLADOS DE <i>Plantago australis</i> E <i>Plantago major</i> .....	173
10.	ANEXO 3 – ESTATÍSTICAS ANOVA E TESTE DE TUKEY DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE <i>Plantago australis</i> E <i>Plantago major</i> .....	179



## 1. INTRODUÇÃO



Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), plantas medicinais são "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos". O uso de plantas com finalidade medicinal, visando a prevenção, tratamento e cura, é uma das práticas medicinais mais antigas no mundo (OMS, 2013). O reconhecimento e a credibilidade das plantas medicinais pela população são constantemente reafirmados, por representar frequentemente o único recurso terapêutico de comunidades afastadas ou de baixa renda e grupos étnicos (OMS, 2013).

As plantas medicinais são potencialmente promissoras, uma vez que existem cerca de meio milhão de espécies catalogadas em todo o mundo, sendo que a maioria delas ainda não foi estudada quanto ao seu potencial bioativo. Estudos sobre atividades farmacológicas podem indicar potencial eficácia no tratamento de diversas doenças (NEWMANN & CRAGG, 2012; ATANASOV et al., 2015; WURTZEL; KUTCHAN, 2016).

O uso de matérias-primas vegetais, devido à sua variabilidade, tem muitos inconvenientes, que incluem modificações no teor de compostos sob diferentes climas e solos, desenvolvimento simultâneo de compostos sinérgicos que levam a efeitos adversos, alterações ou perda de bioatividade (KUNLE et al., 2012). Outros fatores, tais como condições de armazenamento e método de extração, também são determinantes para a qualidade das matérias-primas. Alternativamente, o uso de substâncias bioativas isoladas, ou como modelos para síntese química total ou modificações parciais também é relevante (KUNLE et al., 2012).

Para que a indústria farmacêutica aumente a produção de novos fitoterápicos é imprescindível o desenvolvimento de técnicas de quantificação de marcadores químicos nas drogas vegetais, determinação de efeitos terapêuticos associados ao marcador, sempre que possível, e de doses tóxicas, para controlar a qualidade da formulação terapêutica (ZHANG, 2011, BRASIL, 2017). Igualmente é mandatório atender parâmetros de controle de qualidade vigentes na legislação (GURIB-FAKIM, 2006; CAVALCANTE, 2010, BRASIL, 2017).

De acordo com a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (2019), controle de qualidade é um conjunto de medidas que visa garantir a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que atendam às normas de identidade, atividade,

teor, pureza, eficácia e inocuidade (BRASIL, 2019). Nos medicamentos fitoterápicos, as drogas vegetais empregadas como matéria-prima necessitam passar por análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores (BRASIL, 2004).

As monografias das diferentes farmacopeias objetivam estabelecer padrões de qualidade aos insumos, devendo ser cumpridas obrigatoriamente e, em sua totalidade. Para que isso ocorra, a Resolução nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos para metodologias que não são descritas em farmacopeias oficiais (BRASIL, 2017). Apesar do intenso uso de produtos de origem natural, é imprescindível salientar que as drogas vegetais podem apresentar diferenças no teor dos constituintes, deteriorações, contaminações e adulterações, apresentando risco à saúde (SHARAPIN et al., 2000; SHAH & SETH, 2010). Dessa forma, torna-se indispensável realizar o controle de qualidade de drogas vegetais, mediante métodos adequados, especificando a segurança da utilização desses produtos (OMS, 2009; POSADZKI et al., 2013).

Em 2009 o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). O objetivo desta lista é orientar estudos e pesquisas que possam contribuir para a elaboração de fitoterápicos disponíveis para utilização pela população. Dentre estas espécies, consta *Plantago major* L. (tanchagem, tansagem ou tranchagem) usada popularmente e confirmada cientificamente como agente anti-inflamatório, cicatrizante e antitumoral (BRASIL, 2009).

A 2ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, resultado da revisão das monografias da 1ª edição e seu Primeiro Suplemento, contempla 85 (oitenta e cinco) monografias de espécies de drogas vegetais. Neste documento constam duas formulações relacionadas a *P. major*, que tratam de uma preparação extemporânea e de uma tintura, indicadas como anti-inflamatório e antisséptico da cavidade oral (BRASIL, 2021). Pesquisando nas Farmacopeias atuais verificamos a existência de duas monografias para *Plantago major* propondo métodos de identificação e doseamento de marcadores químicos utilizando tintura-mãe. No entanto, essas metodologias são de difícil reprodutibilidade e, portanto, inadequadas para utilização.

Na Farmacopeia Homeopática Alemã (2013) a monografia desta espécie propõe uma técnica de identificação por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como substâncias de referências o cloridrato de quinina, procaína e citral. A utilização destes marcadores torna esta monografia inviável, diante das exigências da legislação atual.

A Farmacopeia Francesa (2007) propõe um método de doseamento do iridoide aucubina por cromatografia líquida utilizando fase móvel isocrática. Essa monografia indica um método de identificação de adulteração de uma tintura-mãe também por CCD, onde são utilizados aucubina e verbascosídeo (sin. acteosídeo), um feniletanoide que ocorre em várias espécies do gênero. De acordo com o método, a presença de verbascosídeo indica que a tintura-mãe foi adulterada com a tintura de *Plantago lanceolata* (Farmacopeia Francesa, 2007).

De acordo com a Farmacopeia Francesa, o *P. major* não apresenta em sua composição o verbascosídeo. Entretanto, há diversos relatos na literatura sobre a presença desse composto em *P. major* (GHEDIRA et al.; 2008; ZUBAIR et al., 2011; GONÇALVES, 2016). Mesmo que alguns autores afirmem que os compostos majoritários sejam o feniletanoide plantamajosídeo e o iridoide aucubina, a espécie também apresenta o verbascosídeo em sua composição (GHEDIRA et al.; 2008; ADOM, 2017). Isso indica que essas monografias não podem ser utilizadas no controle de qualidade de matéria-prima de droga vegetal.

Nas Farmacopeias atuais não identificamos monografias publicadas referentes a *P. australis*. Por esta espécie vegetal ser mais facilmente encontrada do que *P. major*, optamos por iniciar os experimentos com esta espécie.

Tendo em vista que as monografias publicadas de *P. major* sugerem métodos obsoletos para identificação e quantificação de marcadores químicos, foi proposto otimizar metodologia de extração para análise do marcador químico e desenvolver e validar métodos analíticos conforme os critérios contidos nos compêndios oficiais.



## 2. OBJETIVOS



## 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e validar métodos analíticos visando a determinação quantitativa do marcador químico verbascosídeo presente em *P. major* e *P. australis* (Plantaginaceae).

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar, coletar e identificar espécies de *P. major* e *P. australis*;
- Preparar extratos, fracionar e obter frações enriquecidas em feniletanoides glicosídicos;
- Isolar, purificar e elucidar estruturalmente os feniletanoides glicosídicos presentes nas frações das espécies alvo;
- Otimizar método de extração de feniletanoides presentes em *P. major* e *P. australis* com auxílio do software Minitab®;
- Determinar, através do método gravimétrico, o teor de umidade das espécies de *P. major* e *P. australis*;
- Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação quantitativa do marcador na droga vegetal *P. major* e *P. australis*, conforme critérios contidos nos compêndios oficiais:
  - Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta e Ultra Eficiência com Detecção por Ultravioleta (CLAE/UV e CLUE/UV).



### 3. REVISÃO DA LITERATURA



### 3.1. FAMÍLIA PLANTAGINACEAE

A família Plantaginaceae pertencente à ordem Lamiales. As espécies desta família são cosmopolitas e morfológicamente variadas devido a alteração na evolução da polinização (SOUZA & LORENZI, 2008).

Para autores como Decaisne (1852), Bentham & Hooker (1876), Pilger (1937), Rahn (1966, 1979, 1995), Cabrera & Zardini (1978), Tolaba & Fabbroni (1998) a família Plantaginaceae tradicionalmente consistia em três gêneros, *Plantago* L., *Littorella* Berg. e *Bougueria* Decne. Em 1999, Judd e colaboradores, com base em estudos de caracteres cpDNA, ampliaram esta família para 13 gêneros, em sua maioria previamente pertencente à família Scrophulariaceae. Em 2002, Judd e colaboradores ampliaram a família Plantaginaceae para 104 gêneros. Estudos filogenéticos mais detalhados, além da reavaliação de dados morfológicos e embriológicos, levaram ao reconhecimento de 120 gêneros pertencentes à família Plantaginaceae (The Plant List, 2021).

As espécies de Plantaginaceae, em sua maioria, são ervas, arbustos e algumas plantas aquáticas, com folhas simples, espiraladas ou opostas. As inflorescências, encontram-se sustentadas no caule caracteristicamente de 5 a 40 cm de altura, com formato de um cone curto ou um espigão longo, onde florescem numerosas pequenas flores, responsáveis pela polinização. As flores variam entre 4 a 5 sépalas e são polissimétricas. O fruto aquênio ou cápsula abre naturalmente ao alcançar a maturação na região mediana ou próximo a base (SAMUELSEN, 2000; ALBACH, 2005).

Diversas espécies desta família são usadas por apresentarem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, hemostática, antiulcerosa e expectorante. Os compostos biologicamente ativos presentes nessas plantas são principalmente fenilpropanoides glicosídicos, iridoides, triterpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, polissacarídeos, vitaminas e lipídios (TASKOVA et al., 2005; RAZIK et al., 2012).

### 3.2. GÊNERO *Plantago*

O gênero *Plantago* L. pertence à família Plantaginaceae, com 414 espécies de ervas anuais e perenes e subarbustos com polinização anemófila distribuídas em todo mundo (Figura 3-1) (JANČIĆ, 2002; TROPICOS, 2019). *Plantago* é um gênero taxonomicamente complexo devido à pouca diferenciação das características que possam auxiliar na classificação e identificação de seus subgêneros. Nem mesmo os estudos filogenéticos morfológicos e moleculares foram capazes de estabelecer relações entre as seções e espécies (RAHN, 1974, 1996; RØNSTED et al., 2000).

No Brasil ocorrem aproximadamente 22 espécies, localizadas em áreas elevadas nas regiões temperadas e tropicais do Norte até o Sul, sendo que somente 10 são nativas (RAHN, 1966; SOUZA & SOUZA, 2002; SOUZA, 2015). As espécies do gênero *Plantago*, conhecidas popularmente como transagem, podem chegar até 40 cm de altura. As folhas são rosetas, ovaladas a elípticas com nervuras paralelas, se apresentam como glabras com as extremidades irregularmente dentadas, tricomas formados por somente uma fileira de células cilíndricas (HADDADIAN et al., 2014). Inflorescência terminal se caracteriza como um cone ou espiga densa, cilíndrica com flores pequenas e sustentada por um escapo comprido. A espiga é curta durante a floração e posteriormente se alonga (SOUZA & SOUZA, 2002; HEFLER et al., 2011).



Figura 3-1: Espécies do gênero *Plantago*: *Plantago australis* Lam; *Plantago lanceolata* L.; *Plantago major* L.

As flores desta espécie crescem na base da roseta abertas ou fechadas; as 4 grandes anteras e o estigma encontra-se nos lobos eretos; deiscência das anteras pequenas ocorre na base do estigma; sépalas ventrais encontram-se unidas na base

ou ao longo do comprimento. O fruto é uma cápsula membranácea e circuncisa após a deiscência na região mediana. As espécies produzem grande quantidade de sementes pequenas e ovais, com sabor levemente amargo (RAHN, 1974, 1996; SAMUELSEN, 2000; SOUZA & SOUZA, 2002).

Ainda que as espécies de *Plantago* sejam largamente conhecidas como ervas daninhas, sua utilização como planta medicinal é uma prática secular. O uso medicinal de diferentes espécies do gênero é reconhecido pela OMS, PDR for Herbal Medicines, Farmacopeias Britânica, Alemã, Francesa, Japonesa, Canadense, Indiana, Natural Health Products, entre outras (BRASIL, 3009). Nestas publicações podemos encontrar a descrição botânica das espécies, caracterização química e farmacológica, contraindicações, dosagem, método de identificação e doseamento.

### 3.2.1. *Plantago australis* Lam.

A espécie *P. australis* tem ocorrência no sul do Arizona até o México, América Central, na maioria da América do Sul e planícies tropicais. No Brasil ocorre nas regiões sudeste e sul como planta invasora de culturas. Conhecida popularmente como cinco-nervos, língua-de-vaca, tansagem e tranchagem, se apresenta como erva perene e sua raiz principal é pouco desenvolvida (SOUZA & SOUZA, 2002). Sua floração ocorre normalmente de setembro a fevereiro (Figura 3-2) (HEFLER et al., 2011).



Figura 3-2: *Plantago australis* Lam.

As folhas são elípticas, elípticas-lanceoladas ou oblanceoladas, esporadicamente rômbricas, ápice agudo ou obtuso, margem inteira a esparsamente denteada, possui uma base atenuada a longamente atenuada semelhante a um pecíolo, face adaxial (parte superior) subglabra a pubescente, face abaxial (parte inferior) pubescente, tricomas articulados com 5 nervuras. Escapo possui cerca de 10 a 29 cm, com característica pubescente a tomentoso, os tricomas são articulados voltados para o ápice. A espiga varia de 9 a 36 cm, as brácteas são triangulares, lanceoladas ou elípticas, ápice agudo, subciliada, glabras ou com tricomas esparsos na nervura central. As flores de *P. australis* apresentam sépalas ventrais unidas apenas na base, elípticas a oblanceoladas, o ápice se desenvolve de forma obtuso a arredondado ou as vezes agudo. Os frutos possuem características ovoides, e com sementes elípticas ou obovais (SOUZA & SOUZA, 2002; HEFLER et al., 2011).

Estudos fitoquímicos revelaram vários compostos em *P. australis*. Dentre eles, podemos citar o iridoide aucubina e os feniletanoides salidrosideo, isoverbascosídeo e verbascosídeo, dentre outros compostos (ANDARY et al., 1988; RØNSTED et al., 2000).

Na medicina popular *P. australis* é empregada como diurético, anti-inflamatório, antibacteriano, cicatrizante, entre outros (BÜRGER et al., 2002; PALMEIRO et al., 2002b). Algumas dessas atividades farmacológicas atribuídas aos extratos dessas espécies foram investigadas, e os resultados estão descritos a seguir.

Em estudos com extratos hidroalcoólicos de folhas, raízes e frutos (250, 500 e 1000 mg/kg) de *P. australis*, após os tempos de 120, 180 e 240 min, os resultados indicaram atividade anti-inflamatória utilizando o modelo de edema de pata traseira do rato induzido por caragenina; e atividade analgésica usando o ensaio de contorções induzidas por ácido acético em camundongos (PALMEIRO et al., 2002b). Outros estudos realizados utilizando extrato aquoso de folhas de *P. australis* demonstraram baixa toxicidade aguda em camundongos após administração pela via intraperitoneal ou oral (PALMEIRO et al., 2002a, 2003).

O extrato etanólico bruto de folhas de *P. australis* demonstrou redução das úlceras de estresse induzidas por álcool (500 e 1000 mg/kg), sendo que na maior dose ocorreu um aumento na produção de muco. A dose de 1000 mg/kg reduziu o índice de lesão das úlceras de estresse por contenção a frio, não houve redução das úlceras induzidas por indometacina (BÜRGER et al., 2002).

No ensaio para determinação de mutagenicidade *Salmonella*/microsossoma, o extrato hidroalcolico das folhas de *P. australis*, não apresentou atividade mutagênica ou genotóxica. O ensaio de MTT, concentrações até 1000 µg/mL, demonstrou que esse extrato induziu uma citotoxicidade significativa. Os resultados da avaliação de genotoxicidade por células V79 indicaram que o extrato e o verbascosídeo não são genotóxicos. E este composto não induziu fototoxicidade na avaliação em células 3T3 pelo ensaio de fototoxicidade vermelho neutro (NRU) (HENN, 2019).

De Moura e colaboradores (2018), mostram que o extrato hidroalcolico de *P. australis* apresentou atividade cicatrizante de feridas usando teste de *Scratch*. Promoveu a capacidade migratória de células de queratinócitos (HaCaT) e reverteu o efeito da oxidação nas células N9 ativadas por LPS. Os ensaios *in vivo* comprovaram as atividades anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroetanólico.

### 3.2.2. *Plantago major* L.

*Plantago major* L. é uma espécie vegetal conhecida popularmente como tranchagem, língua-de-vaca e tansagem. Esta espécie é originária do norte da Europa e Ásia Central, adaptou-se bem em regiões tropicais. Na região sul do Brasil encontra-se distribuída de forma descontínua, especialmente em locais abertos ou semi-sombreado, com solos arenosos e úmidos. A floração ocorre entre os meses de outubro e março (Figura 3-3) (DAU et al., 1978; RAHN, 1979).



Figura 3-3: *Plantago major* L.

Essa espécie é uma planta anual, bienal ou perene, raramente sob a forma de subarbustos lenhosos. Raiz pouco desenvolvida, adventícia fibrosa ou axial engrossada ou delgada, raízes secundárias fibrosas. Caules são rizomatosos e ramificados. Pecíolo possui cerca de 5 cm, lâmina de 2 a 9 cm é lanceolada a oval, ápice obtuso ou arredondado, margem denteada, base obtusa as vezes aguda, subglabra em ambas as faces com 5 nervadas (SOUZA & SOUZA, 2002; HEFLER et al., 2011).

O escapo apresenta cerca de 3 cm, no formato subglabro. Espigas brácteas, elípticas a oblanceoladas, ápice obtuso arredondado. Folhas alternadas, glabras, dispostas em rosetas basais, lâminas lineares ou ovaladas elípticas, margens inteiras ou denteadas, ápice agudo, obtuso ou atenuado. Flores pequenas, marrom-esverdeadas, com sépalas ventrais, unidas pela base, ovais orbiculares a obvais, ápice agudo, obtuso ou arredondado, margem largamente hialina. Frutos são ovoides, suas sementes são pequenas, ovais e irregulares com leve sabor amargo (SOUZA & SOUZA, 2002; HEFLER et al., 2011).

Na medicina tradicional, essa espécie é utilizada na terapia de feridas, cortes (SAVIKIN et al., 2013), resfriados (MIRALDI et al., 2001), como antisséptico, anti-inflamatório (SAMUELSEN, 2000). As folhas desta espécie são indicadas para uso interno no tratamento de infecções (OLIVEIRA, 2012), diarreia (MIRALDI et al., 2001), tuberculose e hemorragias (SAGANUWAN, 2010). As sementes são utilizadas para disenteria, febre (BADSHAH & HUSSAIN, 2011) e hemorroidas (SEZIK et al., 2001). A utilização das folhas associadas a outras plantas é relatada para o tratamento de tosse, lesões de pele, reumatismo e cálculos renais (SANZ-BISET et al., 2009; PETKEVICIUTE, 2010).

Os frutos são utilizados como adstringentes, tônicos, estimulantes, antipiréticos, antissépticos, para distúrbios estomacais e disenteria (SEZIK et al., 2001; MIRALDI, 2001; OSOSKI et al., 2002; BADSHAH et al., 2011; HAQ et al., 2011).

As principais classes de compostos químicos encontradas nas raízes, sementes, folhas, talos de flores e pecíolos de *P. major* são, feniletanoides glicosilados e iridoïdes glicosilados, sendo a aucubina descrito por alguns autores como composto majoritário desta espécie (ZUBAIR et al., 2011; 2012b; GONÇALVES, 2016).

Ensaio de toxicidade pré-clínica e de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* utilizando extratos, frações e compostos isolados de *P. major*, e associações deste com outras espécies vegetais foram realizados, dentre eles: atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, antiviral, cicatrizante e hepatoprotetora (Tabela 4-1).

Tabela 4-1: Ensaios pré-clínicos – ensaios toxicológicos e farmacológicos descritos na literatura com *P. major* L.

Ensaios toxicológicos						
Parte planta	Tipo de experimento	Tipo de extração	Concentração	Experimento	Resultados	Referência
Folhas Raízes	Toxicidade aguda	Decocto	50 mg/kg	<i>In vivo</i> Ratos Wistar machos Via intraperitoneal	Extrato aquoso das folhas: Não há mudanças na amplitude dos picos epiléticos induzidos por penicilina Extrato aquoso das raízes: Aumento na amplitude de picos Presença de sais de potássio na planta sugerem ser responsáveis pelo aumento da excitabilidade neuronal	Rodriguez & Perez-Saad, 1996
Folhas	Toxicidade aguda	Extrato fluído	5950, 8300 e 11900 mg/kg	<i>In vivo</i> Ratos Swiss Via oral (intragástrica)	DL <sub>50</sub> determinada foi de 7488,6 mg/kg Primeiras 24 hs após administração: apresentaram respiração acelerada e convulsões nos animais A autópsia após 14 dias: não houve alterações patológicas nos órgãos analisados Extrato não é tóxico, uma vez que valores maiores que 2000 mg/kg	Parra et al., 1999
Folhas	Toxicidade aguda	Tintura	10, 100 e 1000 µg/mL	<i>In vitro</i> <i>Artemia salina</i> L. DL <sub>50</sub> de larvas vivas  <i>In vivo</i> Camundongos albinos Via oral – dose única	<i>In vitro</i> : DL <sub>50</sub> de 4,74 µg/mL  <i>In vivo</i> : DL <sub>50</sub> após 24 hs tratamento de 182,54 mg/kg	Parra et al., 2001
Cassaú Composto®  ( <i>Aristolochia cymbifera</i> , <i>Plantago major</i> , <i>Luehea grandiflora</i> , <i>Myrocarpus</i> )	Toxicidade aguda	* Fitoterápico	26 mL/kg,	<i>In vivo</i> Ratos Wistar Via oral Administração do composto 2 vezes, intervalo de 15 min entre as administrações  Dois grupos de animais (n = 6/sexo)	Sinais de toxicidade sistêmica Ataxia transitória e reversível Sem mortes Sem aumento no peso corporal dos animais, consumo de água e ração, produções de urina e fezes e alterações macroscópicas nos órgãos dos animais	Rauber, 2006

<i>frondosus</i> e <i>Piptadenia</i> <i>colubrina</i> )						
	Toxicidade aguda	Extratos hexano, acetato de etila e metanol	10, 100, 500 e 1000 ppm	<i>In vitro</i> <i>Artemia urmiana</i> (camarões de água salgada)	Todos os extratos: Mortalidade (100%) a 1000 µg/mL Extrato acetato de etila: DL <sub>50</sub> 218 µg/mL (menor valor) Tóxico para células tumorais e normais	Mirzaei, et al., 2011
Folhas	Toxicidade subcrônica	Extrato aquoso	2000 mg/kg	<i>In vivo</i> Ratos albinos (linhagem NGP) Administração diária Via oral 40 dias Dois grupos de animais (n = 6)	Nenhuma morte após administração Segundo dia de tratamento: diminuição do reflexo de direção 12º dia – até o final do ensaio: diminuição na reação de alarme e atividade agarradora anterior e posterior Sem diferença no peso corporal Ligeira ação depressora sobre o sistema nervoso central	González, et al., 2003
	Toxicidade subcrônica	Fitoterápico	1,3; 6,5 e 13 mL/kg	<i>In vivo</i> Ratos Wistar Via oral 30 dias Quatro grupos de animais (n = 10/sexo/dose)	Ausência de toxicidade sistêmica Sem alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas, peso e análises histopatológicas dos órgãos Fitoterápico seguro	Rauber, 2006
	Genotoxicidade	Extrato fluido		<i>In vitro</i> <i>Aspergillus nidulans</i> D-30 (conídios) Inoculação após 72h Incubação a 37° C	Ausência de efeito genotóxico e toxicidade (valor de índice de toxicidade igual a -2)	Ruiz et al., 1996
Folhas	Irritação cutânea	Extrato hidroalcoólico Creme hidrofílico	0,5 g	<i>In vivo</i> Coelhos albinos híbridos Via tópica (dose única)	Após 24 hs: eritema momentâneo, pouco perceptível Após 72 hs: sem eritema Sem edema Taxa de irritabilidade dérmica primária foi de 0,33 Brevemente irritante	Pargas et al., 1996
Folhas	Irritação ocular	Extrato	200 µL	<i>In vivo</i>	Sem irritação ocular	González, et al., 2003

			Coelhos albinos (linhagem New Zeland) 100 mg/mL (olho direito) 200 µL – água destilada (olho esquerdo controle) 5 dias 5 animais		
Ensaio farmacológico					
Ensaio <i>in vitro</i>					
Folhas	Atividade antimicrobiana	Extratos éter de petróleo e etanólico	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella flexneri</i> e <i>Candida albicans</i>	Extrato etanólico: concentração inibitória mínima (CIM) igual a 19,52 µg/mL frente a <i>S. aureus</i> CIM 625 µg/mL para <i>S. epidermidis</i> e <i>C. albicans</i> Extrato éter de petróleo: CIM 156,2 µg/mL frente a <i>S. aureus</i> ; 312,5 µg/mL frente a <i>S. epidermidis</i> ; 625 µg/mL frente a <i>S. flexneri</i> e <i>C. albicans</i> Ambos extratos: pouco ativos frente a <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i> e inativos frente a <i>P. aeruginosa</i>	Ünsal et al., 2010
	Atividade antimicrobiana	Extrato éter de petróleo	<i>E. coli</i>	Halo de inibição de 8 a 9 mm, com valor de CIM igual a 312,5 µg/mL de <i>E. coli</i>	Uzun et al., 2004
	Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Candida galabrata</i> e <i>Candida Krusei</i>	Halos de inibição frente à: <i>E. coli</i> de 11 mm, <i>P. aeruginosa</i> de 10 mm, <i>S. aureus</i> de 13 mm, <i>C. albicans</i> de 7 mm, <i>C. galabrata</i> de 12 mm e <i>C. krusei</i> de 12 mm	Çitoğlu & Altaniar, 2003
	Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico	<i>Pseudomonas vulgaris</i> , <i>E. coli</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Leve atividade frente à <i>P. vulgaris</i> : halo de inibição igual a 7,33 mm Moderada inibição do crescimento de <i>E. coli</i> (42,5 mg/mL) e de <i>B. cereus</i> (42,5 mg/mL)	Karakaş et al., 2012 Metiner et al., 2012
Folhas Flores	Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico	<i>C. albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Candida kerfyr</i> .	Inibição total frente a <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> Inibição fraca ativo frente a <i>C. guilliermondii</i> Inativo frente às cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. kerfyr</i>	Vargas Neto, 2004

Folhas	Atividade antimicrobiana	Extrato hidroalcoólico		<i>C. krusei</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. tropicalis</i>	Inibição moderada frente a <i>Candida krusei</i> (125 µg/mL) Inibição fraca frente a <i>S. aureus</i> e <i>C. tropicalis</i> (1000 µg/mL)	Achata & Quiroz, 2005
Partes aéreas	Atividade antimicrobiana	Extratos aquoso, metanólico, clorofórmico e hexânico	0,4 a 0,025 g/mL	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>C. albicans</i>	Extrato aquoso: inibiu <i>B. subtilis</i> de 78 a 21% Extrato hexânico: inibiu <i>E. coli</i> de 94 a 37% Extrato metanólico: inibição fraca de <i>B. subtilis</i> Extrato clorofórmico: inibição fraca de <i>E. coli</i>	Velasco-Lezama et al., 2006
Folhas	Atividade antimicrobiana	Extrato por compressão em filtro		<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> tipo A e <i>S. pyogenes</i>	Potente atividade frente <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> tipo A e <i>S. pyogenes</i> : halos de inibição iguais à: 6,0; 4,5 e 4,4 cm, respectivamente	De Lima Neto, 1991
Folhas	Atividade antimicrobiana	Extrato hidroalcoólico		Doze isolados de <i>S. aureus</i> a partir de secreções da pele, vagina e orofaringe de pacientes	Todas as cepas sensíveis (10 a 16 mm de halo de inibição)	Freitas et al., 2002
	Atividade antimicrobiana	Extrato metanólico		6 gram-negativas 3 gram-positivas 5 fungos, todos ATCC	Atividade frente: <i>E. faecalis</i> e <i>E. aerogenes</i> (zona de inibição de 10 a 16 mm – entre 0,615 e 20 µg/disco); <i>C. parapsilosis</i> (zona de inibição de 15 mm – entre 0,077 e 0,039 µg/disco) Determinação da CIM: atividade moderada para <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> (CIM = 500 µg/mL) e baixa atividade para <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>S. flexneri</i> (CIM = 1000 µg/mL)	De Paula, 2010
	Atividade antimicrobiana	Extrato acetônico		<i>B. cereus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	Inibição de crescimento frente: <i>B. cereus</i> (3,56 mg/mL), <i>S. enteritidis</i> (7,13 mg/mL), <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> (14,25 mg/mL)	Metiner et al., 2012
Partes aéreas	Atividade antimicrobiana	Extrato aquoso, metanólico e aquoso		<i>Helicobacter pylori</i>	Agentes fracos anti- <i>H. pylori</i> Determinação da CIM: Extrato metanólico – 250 µg/mL	Castillo-Juárez et al., 2009

					Extrato aquoso – 1000 µg/mL Extrato etanólico – sem determinação	Cogo et al., 2010
	Atividade antimicrobiana	Extrato metanólico		<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Microsporum cookei</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trichoderma viridae</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Inibiu o crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>M. gypseum</i> e <i>S. cerevisiae</i> com diâmetro médio de inibição entre 8 e 10 mm	McCutcheon et al., 1994
Partes aéreas	Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico	50; 100; 12,5 e 50 µg/mL	<i>Listeria</i> ( <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , e <i>L. murrayi</i> )	Determinação da CIM: mais ativo frente à <i>L. innocua</i>	Altanlar et al., 2006
Folhas	Atividade antimicrobiana	Extrato hidroalcoólico		<i>In vitro</i> <i>C. albicans</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	Inibiu o crescimento frente a <i>C. albicans</i> de 24 a 27 mm, frente a <i>T. rubrum</i> de 10 a 17 mm	Pargas et al., 1996
	Atividade antimicrobiana	Extrato hidroalcoólico		<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	Enxaguatório bucal: CIM variaram de 625 µL/mL a 2500 µL/mL Mistura de extratos vegetais: CIM variaram de 9,44 mg/mL a 37,75 mg/mL	Cordeiro, 2005
		Mistura de drogas de drogas (dentre eles o de <i>P. major</i> )		Enxaguatório bucal e gel dentífrico	Gel dentífrico: CIM de 25 mg/MI Extratos hidroalcoólicos: apresentaram atividade bactérias gram-positivas	Cordeiro et al., 2006
Partes aéreas	Atividade anti-inflamatória	Extratos com diclorometano e fluido supercrítico (FSC) purificado com etanol e heptano	100 µg/ mL.	Enzimas ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e lisil-oxidase (LOX-12)	COX-1: Extrato com diclorometano fracionado com etanol e heptano 47 e 67% Extrato FSC purificados com etanol e heptano 44 e 67% COX-2: Extrato com diclorometano fracionado com etanol e heptano 58 e 34% Extrato FSC purificados com etanol e heptano 65 e 11%	Stenholm et al., 2013
	Atividade anti-inflamatória	Ácidos ursólico, oleanólico, linolênico e linoleico		CI <sub>50</sub> Enzimas ciclooxigenase (COX-1 e COX-2)	COX-1: Ácido ursólico: 210 µM, ácido oleanólico: 130 µM, ácido linolênico: 93 µM e ácido linoleico: 170 µM	Ringbom et al., 1998  Ringbom et al., 2001

				COX-2: Ácido ursólico: 380 µM, ácido oleanólico: 295 µM, ácido linolênico 12 µM e ácido linoleico: 94 µM	Huss, 2003	
	Atividade anti-inflamatória	Frações A e B: ácidos triterpênicos e graxos	100 µg/ mL	Enzimas cicloxigenase (COX-1 e COX-2)	COX-1: Fração A apresentou 62% Fração B apresentou 23% COX-2: Fração A apresentou 78% Fração B apresentou <12%	Ringbom et al., 2001
	Atividade antiviral	Extrato alcoólico		Cepas RC/79 do virus do herpes	Ação anti-herpética	Zanon et al., 1999
	Atividade antiviral	Extrato aquoso		<i>Herpes simplex</i> tipo 2 (HSV-2)	CI <sub>50</sub> de 852 µg/mL frente ao vírus	Lin et al., 2003
	Atividade antiviral	Extrato aquoso		<i>Herpes simplex</i> (HSV-1 e HSV-2) Virus ADV-3, ADV-8 e ADV-11	HSV-2: atividade inibitória moderada DE <sub>50</sub> >200 µg/mL Atividade inibitória de DE <sub>50</sub> igual a 843 µg/mL	Chiang et al., 2002 Chiang et al., 2003
	Atividade citotóxica	Extrato aquoso		Linhagens celulares de câncer: estômago, rins, ósseo, cólon do útero, duas de pulmão, boca, bexiga e linfoma	Efeito inibitório (CI <sub>50</sub> ) variou de 218 a 308 µg/mL	Chiang et al., 2003
Folhas secas	Atividade citotóxica	Extrato metanólico		Adenocarcinoma renal humano (TK-10), adenocarcinoma da mama humano (MCF-7) e melanoma humano (UACC-62)	Inativo para células TK-10 Inibição do crescimento celular em 50% das células: 46,5; 97,5 e 207 µg/mL, frente às células MCF-7. Valores que causaram 50% de morte celular: 46,5; 112,5 e 247 µg/mL frente às células UACC-62	Lin et al., 2002
	Atividade citotóxica	Extrato metanólico		Efeitos quimio preventivo e mecanismos de ação frente a células 27 neoplásicas transformadas de epiderme de ratos	Suprimiu a transformação das células neoplásicas Inibiu a atividade quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico Suprimiu ativação do receptor somente nas células transformadas Inibiu a proliferação celular induzida pelo fator de crescimento epidérmico em fibroblastos embrionários	Choi et al., 2012

	Atividade citotóxica	Extrato aquoso		Linhagens celulares cancerosas de fígado humano: HepG2/C3A (ATCC CRL-10741), HA22T/VGH (CCRC 60168), SK-HEP-1 (ATCC HTB-52), Hep3B (ATCC HB-8064) e PLC/PRF/5 (ATCC CRL-8024)	Linhagem HA22T/VGH: CI <sub>50</sub> da amostra foi de 1559,6 µg/mL HepG2/C3A: inibição foi de 36,3%, na dose de 2000 µg/mL PLC/PRF/5 e Hep 3B: atividades de 22,8% e 6,2%	Lin et al., 2002
Partes aéreas	Atividade citotóxica	Extrato metanólico	1 µg/mL	Linhagens celulares humanas de câncer de cólon (HCT-15), cervical (SQC-UIISO), de ovário (OVCAR) e de nasofaringe (KB) 72 hs de incubação	Linhagens celulares UIISO e OVCAR, citotoxicidade de 61 e 22% de células viáveis, respectivamente	Velasco-Lezama et al., 2006
	Atividade cicatrizante	Proteína S-100		Método de adesão em cultura de tecidos de fígado de ratos proliferação de fibroblastos humanos	Proteína S-100: Ativa sobre a membrana: 10-10 a 10-13 mg/mL Influencia na proliferação de fibroblastos humanos Aumento na velocidade do crescimento celular	Krasnov et al., 2003
Folhas secas e frescas	Atividade cicatrizante	Extratos hidroalcoólico e aquoso (folhas secas) Extrato aquoso (folhas frescas)	10, 1 e 0,1 mg/mL	Capacidade de proliferação/migração Linhagem celular epitelial oral H400 18 hs	Todos os extratos: aumentou a proliferação/migração das células epiteliais bucais; e dose de 1 mg/mL ideal Extrato etanólico (folhas secas) 0,1 e 1 mg/mL: melhores efeitos	Zubair et al., 2012a
Folhas	Atividade cicatrizante	Pectina PMII		Capacidade ativadora do sistema complemento	Pectina PMII: potente ativador do sistema complemento	Michaelsen et al., 2000
<i>Ensaio in vivo</i>						
Folhas	Atividade anti-inflamatória	Extrato aquoso		Método de edema de pata de rato Indução por carragenina Ratos Wistar Via oral	Após 1 h: 50 mg/kg – reduziu o edema de pata Após 2 hs: redução altamente significativa Após 3 hs: sem diferenças	Cámbar et al., 1985
Folhas	Atividade anti-inflamatória	Extrato aquoso	1 g/kg/dia	Edema de pata de rato e pleurisia Indução por carragenina	Resposta inflamatória intensa	Guillen et al., 1997

				Via oral 8 dias		
	Atividade anti-inflamatória	Extratos liofilizados		Ratos Wistar albinos Indução por carragenina e prostaglandina E1	Inibiu os efeitos inflamatórios e infiltração de leucócitos	Shipochliev et al., 1981
	Atividade antitumoral e citotóxica	Extrato		Adenocarcinoma de Ehrlich, carcinoma de pulmão de Lewis – LLC	Demonstrou atividade antimetastática (carcinoma de pulmão de Lewis), Inibição dos nódulos do tumor	Gol'dberg et al., 2004
Folhas	Atividade antitumoral e citotóxica	Infusão	1, 2 e 3%	Tumores de Ehrlich (1×10 <sup>6</sup> células) Camundongos	Sem efeitos secundários tóxicos Infusão a 1%: sem invasão de células tumorais no cólon de 50% dos animais Infusão a 2 e 3%: sem invasão de 33% dos animais Histologia normal	Ozaslan et al., 2007
Folhas	Atividade antitumoral e citotóxica	Infusão	25, 50 e 75 µg/mL	Animais com células de tumor de Ehrlich injetadas intraperitonealmente Via oral 10 dias	Inibição do tumor: 25 µg/mL > grupo 50 µg/mL > grupo 75 µg/mL 25 µg/mL dose mais eficaz	Ozaslan et al., 2009
	Atividade antitumoral e citotóxica	Fluido intracelular		Camundongos femininos (linhagem C3H) Via subcutânea Idade e frequência do aparecimento do câncer	Frequência de formação do câncer de mama foi de 18,2% nos tratados	Lithander, 1992
	Atividade antitumoral e citotóxica		20 mg/mL	Ratos da linhagem C57BL/6 Via oral, diariamente 8 semanas	Índice apoptótico das análises histológicas do cólon proximal superior ao do controle positivo Índice mitótico inferior ao do controle negativo	Ozaslan et al., 2007
Folhas	Atividade cicatrizante	Extrato hidroalcoólico		Ratos Wistar Lesões na região lombar	Aceleração no processo de cicatrização 7 e 10 dias após tratamento: aumento de fibroblastos 14 dias: número de fibras colágenas decaiu	De Lima Neto, 1991
	Atividade cicatrizante	Extrato		Lesões na área cervical dorsal de ratos Administração tópica	15 dias após tratamento: fechamento completo das feridas Formação eficiente de novo epitélio	Thomé et al., 2012

	Atividade cicatrizante	Solução tópica	Concentrações de 20 e 50%	Após 7, 14 e 21 dias de tratamento, os ratos foram sacrificados Áreas das queimaduras foram examinadas por análises histológicas	21º dia de tratamento: diferença significativa entre os grupos tratado e controle Melhores resultados foram constatados nos animais do grupo que recebeu solução a 50% Óleo de "plantain" demonstrou atividade terapêutica sobre queimaduras em olhos de coelhos, produzindo ação terapêutica essencial nessas queimaduras químicas	Amini et al., 2010
Folhas	Atividade cicatrizante	Fração proteica e da solução salina das folhas	100 µL	Excisada porção de pele de ratos, sob anestesia Aplicação diária	11º dia após o tratamento fração proteica: quase completa re-epitelização na superfície da ferida e, uma ligeira inflamação na camada subepidérmica Crescimento de tecido adiposo subcutâneo e a recuperação de ductos das glândulas Tratamento das feridas com solução salina, também foi observada formação de tecido	Krasnov et al., 2011
	Atividade cicatrizante	Extrato hexânico e fração não hidrolisada	Solução a 25% do extrato hexânico Solução a 10% da fração não hidrolisada	Coelhos Cicatrizantes de feridas	15 a 18 dias após tratamento: extrato hexânico e a fração não hidrolisável, resultou na evidente cura 14 a 17 dias após tratamento: epitelização considerável na região lesionada Fibras de colágeno ordenadas e a estratificação do epitélio de revestimento foi completa	Mironov et al., 1984
	Atividade antiúlcera e gastroprotetora	Extrato metanólico e infusão		Ratos Atividade gastroprotetora Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto	Induziu proteção contra as lesões gástricas Sem toxicidade aguda em doses de até 2 g/kg	Abud et al., 2012
Folhas	Atividade antiúlcera e gastroprotetora	Extrato		Cães Atividades na secreção e proteção gástrica	Efeito estimulante sobre a secreção gástrica (células parietais) Aumento da produção de ácidos e proteção da mucosa gástrica	Stojanovic, 2005
	Atividade antiúlcera e gastroprotetora	Extrato hidroalcoólico		Ratos albinos Potencial na cicatrização de úlceras	Diminuição das úlceras entre 65,6% e 49,7%	Borodina et al., 2008

					Aumento dos fibroblastos, Início do processo de proliferação celular Diminuição de neutrófilos, macrófagos Aceleração da cicatrização da mucosa gástrica danificada	
Sementes	Atividade hepatoprotetora	Extrato metanólico		Doseamento as enzimas marcadoras: AST, ALT e GGT Análises histopatológicas do tecido hepático	Diminuição dos níveis das transaminases séricas (ALT e AST) e da atividade de GGT Alterações moderadas a leves nos hepatócitos, sem toxicidade aguda	Atta et al., 2006
	Atividade hepatoprotetora	Extratos "jigrine"	de 1 mL/kg	Ratos Wistar albinos Via oral Indução de galactosamina 21 dias	Diminuição dos níveis de ALT, AST, ureia e TBARS Sem toxicidade por galactosamina Células hepáticas preservadas Redução de células inflamatórias	Najmi et al., 2005
Partes aéreas	Atividade antimicrobiana	Extrato hidroalcoólico	0,2 mL	Candida na boca de ratos	Colônia de <i>C. albicans</i> foi igual a 4,1x10 <sup>2</sup> , menor que o controle negativo (12,6x10 <sup>2</sup> UFC/mL) Sem candidose na histologia da língua	Vargas Neto, 2004
Folhas Pectina PMII	Atividade antimicrobiana	Extrato etanólico	12 µg, 120 µg e 1,2 mg	Ratos Cepa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Após 24 horas de tratamentos: diminuição dos níveis de bacteremia nos animais tratados com 12 µg de PMII Após três dias de tratamentos: animais do grupo controle negativo morreram, e 50% dos tratados com PMII sobreviveram Dose de 12 µg menor dose de PMII contra a infecção por <i>S. pneumoniae</i>	Hetland et al., 2000

As espécies do gênero *Plantago* possuem diversos componentes químicos de importância farmacológica. Rønsted e colaboradores (2003) relataram a presença de diversas classes de compostos tais como carboidratos, incluindo as mucilagens, flavonoides, esteroides, saponinas, taninos, alcaloides, triterpenos, ácido fenólicos e vitaminas A, C e K. Entretanto, os compostos mais representativos do gênero são feniletanoides glicosídicos e iridoides.

### 3.2.3 Feniletanoides glicosídicos

Feniletanoides glicosídicos (FEG) pertencem a uma classe de produtos naturais solúveis em água largamente distribuídos no reino vegetal (JIMENEZ & RIGUERA, 1994). Estas substâncias podem ser isoladas de raízes, cascas, folhas etc. A partir disso, ao longo de décadas, despertam o interesse de pesquisadores devido a sua aplicabilidade farmacêutica.

A maioria dos FEG descritos foram identificados nas famílias Acanthaceae, Alangiaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bignoniaceae, Buddejaceae, Crassulaceae, Lamiaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae (JIMENEZ & RIGUERA, 1994). Verbascosídeo é um exemplo de composto isolado de diversos gêneros das famílias acima citadas.

FEG são metabólitos secundários caracterizados pela presença de uma fração hidroxifeniletila ligada por uma ligação glicosídica a uma  $\beta$ -glicopirranose (ramnose, xilose, apiose e arabinose). As estruturas do núcleo podem ter substituintes como ácidos aromáticos (ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido isoferúlico) e diversos açúcares (ramnose, xilose, apiose e arabinose) ligados ao resíduo de glicose através de ligações éster ou glicosídicas, respectivamente. Estes compostos são classificados de acordo com o número, tipo e posição dos açúcares na molécula ou nas alterações em suas estruturas centrais (JIMENEZ & RIGUERA, 1994; FU et al., 2008).

Geralmente, a maior parte dos FEG possui menos de quatro porções de açúcar na molécula. A característica mais comum presente nestes compostos é a substituição em C-3' da glicose, sendo  $\alpha$ -L-ramnose o substituinte mais comum nesta posição (BEDIR et al., 2003). Podemos verificar na figura 3-4, exemplos de FEG com diferentes substituintes em C-3' ( $R_2$ ) de glicose.

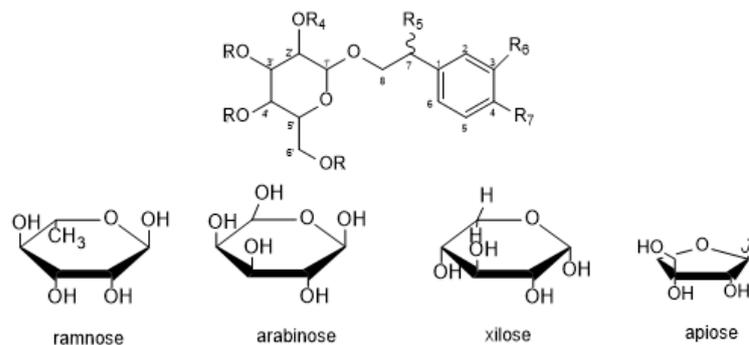


Figura 3-4: FEGs com substituintes em C-3' (R<sub>2</sub>) da glicose.  
 Fonte: Adaptado de Fu e colaboradores, 2008.

Frequentemente são encontrados ácidos cafeico, ferúlico e cinâmico formando um éster em C-4' (R<sub>3</sub>) da glicose enquanto em C-2' (R<sub>1</sub>) e C-6' (R<sub>4</sub>) há ocorrência de xilose, apiose, arabinose e ramnose. A maior parte dos FEG descritos são dissacarídeos ou trissacarídeos com cadeias de açúcar não lineares. Contudo verificamos variações como na cadeia linear glicose-ramnose-glicose do turrilliosídeo B e o newbouldiose C com cadeia linear glicose-ramnose-apiose e uma porção sinapoil. Grupamentos hidroxila, metoxila, etoxila e butoxila podem ser substituintes em C-7 (R<sub>5</sub>) da porção feniletíl dos FEG (BEDIR et al., 2003). A figura 3-5 demonstra exemplos de FEG com as características descritas acima, respectivamente.

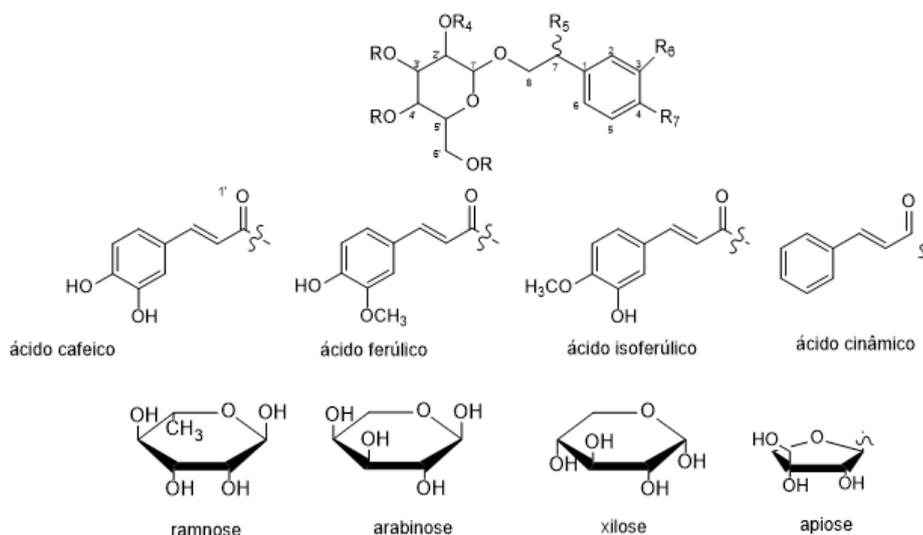


Figura 3-5: FEGs com substituintes em C-2' (R<sub>1</sub>), C-4' (R<sub>3</sub>) e C-6' (R<sub>4</sub>) da glicose.  
 Fonte: Adaptado de Fu e colaboradores, 2008.

Ao longo das últimas décadas, uma enorme quantidade de FEG foi isolada de diferentes espécies, vários estudos demonstraram atividades farmacológicas

destacando-se antioxidante, neuroprotetor, imunoregulador, antitumoral, antiviral, antibacteriano, hepatoprotetor, analgésico e anti-inflamatório. Alguns destes compostos já foram investigados quanto à relação estrutura-atividade e mecanismos de ação (JIMENEZ & RIGUERA, 1994).

Os primeiros FEG isolados serviram como base de estudo de REA e mecanismos de ação. As evidências obtidas demonstraram que são compostos com relevância farmacológica, reforçando a importância de explorar o potencial terapêutico de novos compostos dessa classe (FU et al., 2008). Jimenez e Riguera (1994), em estudos de inibição da aldose redutase, revelaram que orobanchosídeo e verbascosídeo auxiliam na redução da incidência de catarata e neuropatias secundárias em pacientes diabéticos.

Jionosídeo C provavelmente possa ser utilizado como antialérgico ou anti-inflamatório devido a resposta inibitória da 5-lipoxigenase. O estudo de relação estrutura-atividade de feniletanoides de *Remannia glutinosa* (Scrophulariaceae) (acetosídeo, jionosídeo A e B) demonstrou que a fração hidroxifeniletila é responsável pela ação imunossupressora. Cistanosídeo F, também presente nesta planta, que não possui esse grupo, demonstrou atividade reduzida (Figura 3-6) (SASAKI et al., 1989; NISHIMURA et al., 1990).

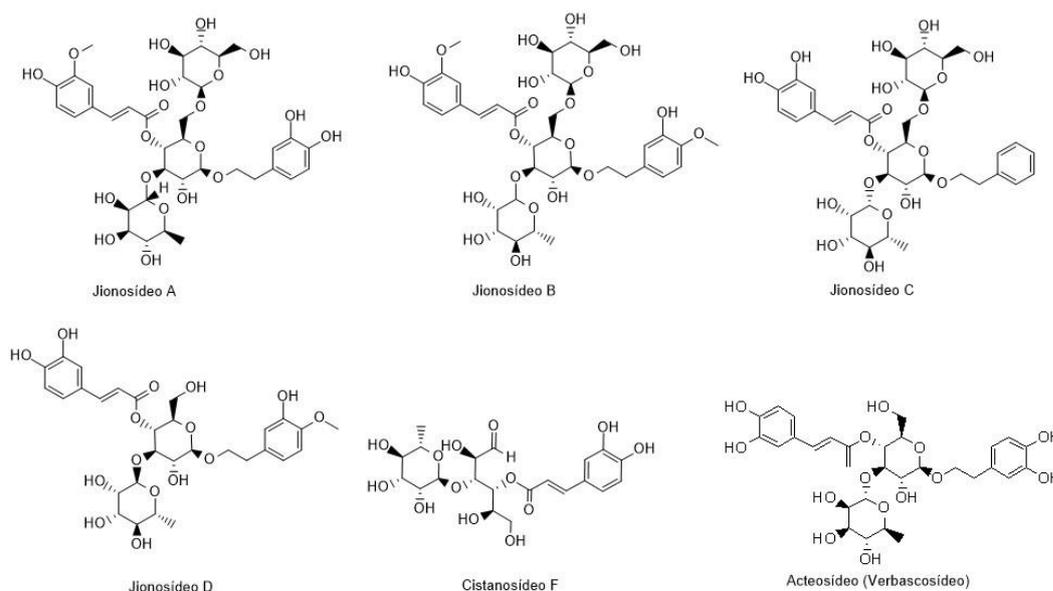


Figura 3-6: FEGs de *Remannia glutinosa* (Scrophulariaceae). (a) jionosídeo A; (b) jionosídeo B; (c) jionosídeo C; (d) cistanosídeo F; (e) verbascosídeo.

Os extratos de *P. major*, *Wulfenia carinthiaca* e *Forsythia suspensa* foram submetidos a reação de Briggs-Rauscher (BR) ou métodos quimiluminescentes e nitroazul tetrazólio onde foi identificada a atividade antioxidante de FEG (TAKEDA et al., 1999; HE et al., 2000; ALIGIANNIS, et al., 2003). Verbascosídeo demonstra ser um agente protetor natural contra a rancidez oxidativa, ou auto-oxidação dos triacilgliceróis com ácidos graxos insaturados por oxigênio (HE et al., 2001). Devido a esta propriedade, estes compostos foram avaliados como potenciais neuroprotetores. No ensaio de MTT, osmantusídeo B, apresentaram atividade neuroprotetora significativa contra a neurotoxicidade induzida pela 6-hidroxi-dopamina (Figura 3-7) (6-OHDA) (SUNG et al., 2006).

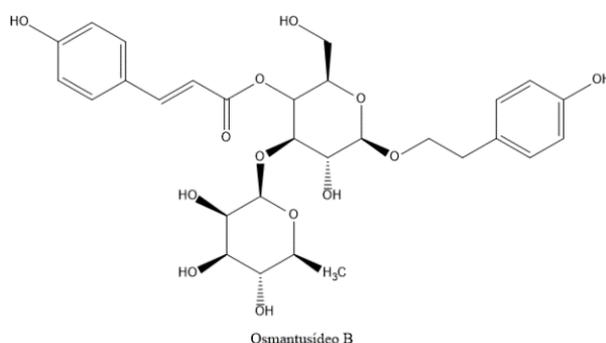


Figura 3-7: FEG com atividade neuroprotetora, osmantusídeo B.

Vários modelos inflamatórios têm sido utilizados para identificar as propriedades anti-inflamatórias dos FEG. Angorosídeo A e C, verbascosídeo e isoverbascosídeo de *Scrophularia scorodonia* foram investigados quanto à capacidade de inibição das funções macrófágicas do processo inflamatório e os resultados apontaram que estas substâncias são os responsáveis geral pelo efeito anti-inflamatório (Figura 3-8) (DIAZ et al., 2004).

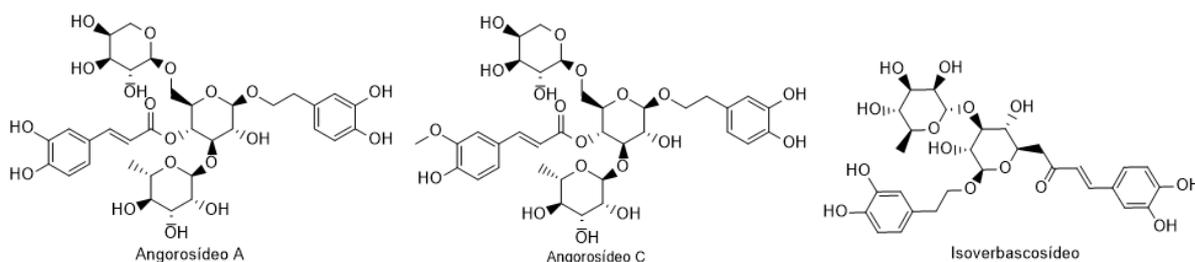


Figura 3-8: FEGs de *Scrophularia scorodonia* com atividade anti-inflamatória.

### 3.2.3.1. Verbascosídeo

Verbascosídeo (sin. acteosídeo, kusaginina, orobanchina), esteroestrutura denominada como  $\beta$ -(3',4'-dihidroxifenil)etil-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(4-O-cafeoil)-glicopiranosídeo (figura 3-9), foi isolado pela primeira por Bridel & Charaux em 1924 de *Orobanche rapum-genistae*, e nomeado como orobanchina. Estudo com este composto demonstrou a presença de monossacarídeos, glicose e ramnose, e ácido cafeico para elucidar parte da estrutura. Em 1963, Scarpati & Delle Monache isolaram de *Verbascum sinuatum* uma substância contendo fragmentos semelhantes, mostrando também a presença de um 3,4 dihidroxifeniletil. Andary et al. (1982) definiram a estrutura completa do verbascosídeo, demonstrando ser idêntico ao acteosídeo, uma substância isolada e identificada de *Syringa vulgaris* (Birkofer e colaboradores, 1968) e *Conandron ramoidioides* (Nonaka & Nishioka, 1977).

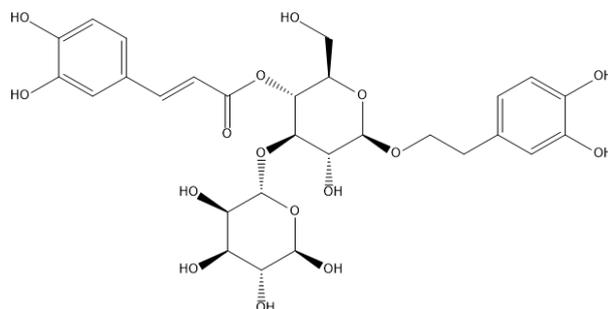


Figura 3-9: Verbascosídeo.

Sakurai & Sato (1983), isolaram um novo glicosídeo, kusaginina, de *Clerodendron trichotomum* Thumb. Técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) realizadas por Andary e colaboradores (1982), Numata (1987) e Steynberg (1988) confirmaram a estrutura do verbascosídeo. Este composto foi determinado como sendo glicosídeo de cafeoil feniletanoide que possui um ácido cafeico, uma aglicona feniletanoide e um grupamento ramnose ligados a glicose nas posições C4', C1' e C3', respectivamente.

O verbascosídeo pode ser encontrado em representantes de várias famílias como: Acanthaceae, Bignoniaceae, Buddlejaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae. Nestes táxons também

encontramos os compostos derivados do verbascosídeo. Destacamos o isoverbascosídeo (sin. isoacteosídeo), em que o ácido cafeico encontra-se esterificado na posição C6' da unidade de glicose, e o forsitiasídeo (sin. forsitosídeo A), onde a unidade de ramnose é inserida na posição C6' da glicose (ANDARY et al., 1982; NUMATA, 1987; STEYNBERG, 1988).

Muitos autores consideram o verbascosídeo como precursor de um conjunto de ésteres trissacarídeos. A terceira unidade de monossarídeos desses compostos podem ser L-ramnose, D-glicose, D-galactose, D-xilose, arabinose L-lixose ou D-apiose (MØLGAARD & RAVN, 1988).

Alguns estudos sobre a biossíntese do verbascosídeo foram realizados para elucidar todas as vias, enzimas e genes que estão envolvidos. Esse composto possui em sua estrutura uma fração hidroxitirosol e uma fração cafeoíla ligadas por uma ligação glicosídica  $\beta$ -glicopirranose (JIMÉNEZ & RIGUERA, 1994).

A biossíntese inicia pela via do chiquimato onde ocorre a formação de precursores de fenilalanina e tirosina (Figura 3-8.). A tiramina e/ou dopamina são responsáveis pela biossíntese da porção hidroxitirosol do verbascosídeo, enquanto uma via de cinamato sintetiza a porção cafeoíla a partir da fenilalamina (ELLIS, 1983). Saimaru & Orihara (2010) sugerem que a incorporação da dopamina na estrutura do verbascosídeo ocorre pela oxidação do aldeído, redução do álcool e, por fim, da  $\beta$ -glicosilação.

Os estudos descritos acima propõem que as vias de biossíntese do verbascosídeo podem diferir entre diferentes espécies de plantas. De acordo com Alipieva e colaboradores (2014), as etapas enzimáticas que envolvem os intermediários de ácido cafeico, salidrosideo, hidroxitirosol, glicose e ramnose do verbascosídeo ainda não foram identificados. Podemos visualizar na figura 3-10 as informações resumidas da via biosintética do verbascosídeo.

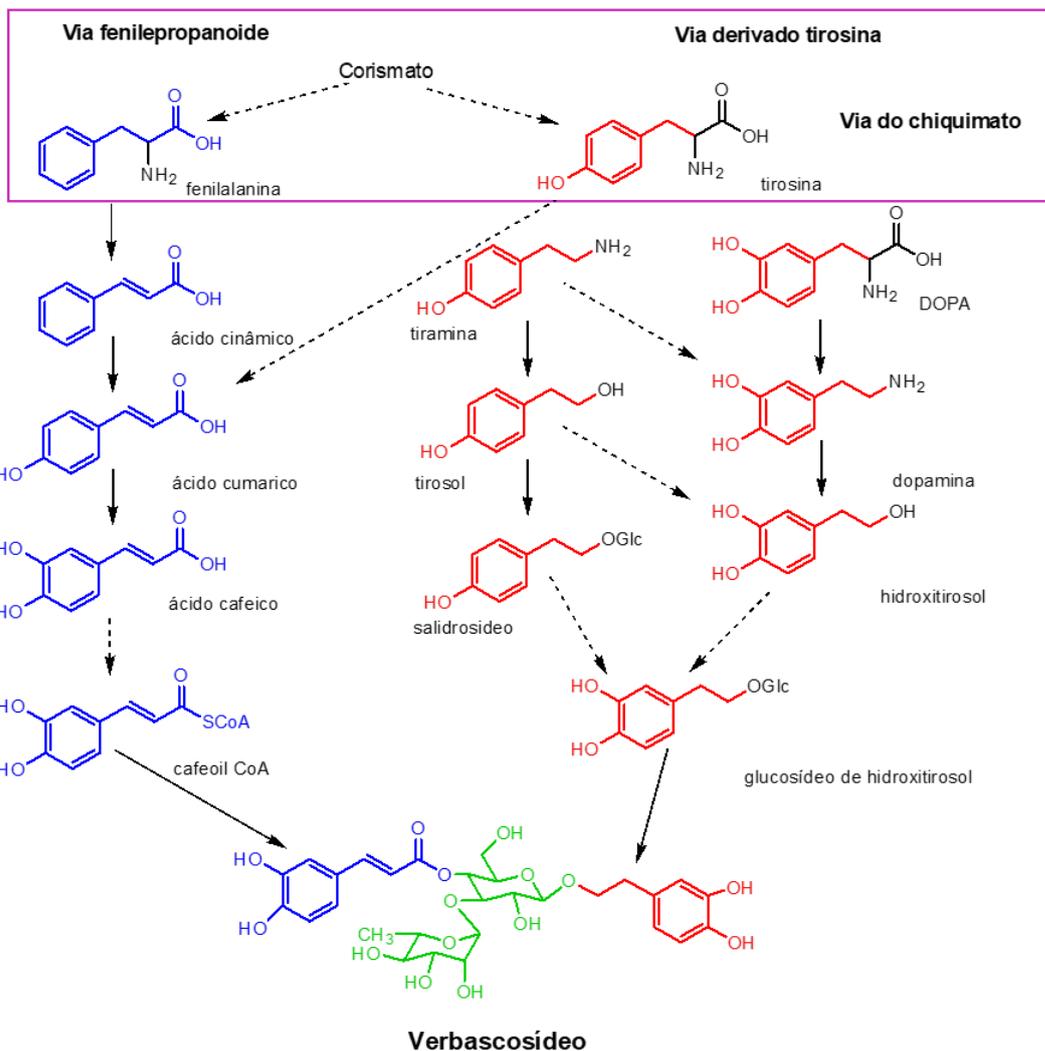


Figura 3-10: Via biosintética do verbascosídeo.  
 Fonte: Adaptado de Alipieva, 2014; Wang e colaboradores, 2017.

Os resultados da análise dos cromatogramas de verbascosídeo por UPLC-ESI-MS/MS realizado por LI e colaboradores (2005), permitiram a identificação do composto e confirmou a massa molecular de 624 m/z [M-H]<sup>-</sup> (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>), produzindo um perfil de fragmentação com dois íons principais 489 e 461 m/z, onde o íon em 461 m/z ocorre devido da porção cafeoil [M-H]<sup>-</sup> 162] e 489 m/z foi gerado da clivagem da ligação ente C8 e C9 [M-H]<sup>-</sup> 134]. O íon 461 m/z gerou um íon fraco em 315 m/z com a perda da porção de ramnose, ao passo que o íon 489 m/z produziu um fragmento em 325 m/z com a perda da unidade 3,4-dihidroxifenetil e do grupamento carbonila (C9) do ácido cafeico (Figura 3-11).

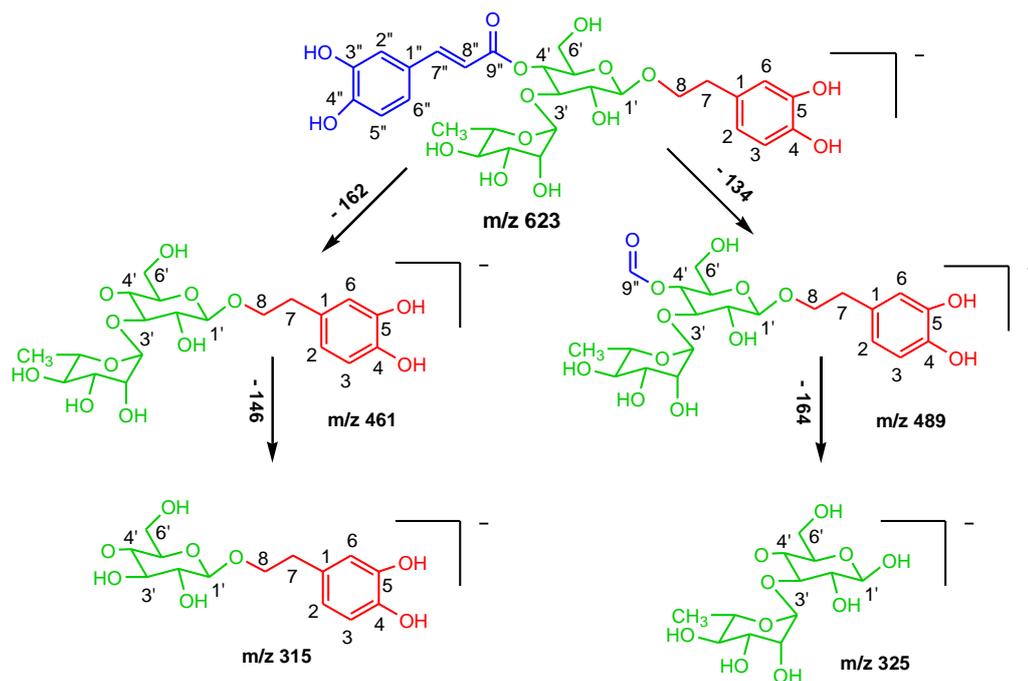


Figura 3-11: Sugestão de via de fragmentação para verbascosídeo.  
 Fonte: Li et al., 2005.

Verbasosídeo pode ser encontrado tanto nas raízes quanto nas partes aéreas de plantas, porém em diferentes quantidades. Kirmizibekmez e colaboradores (2012) isolaram 0,002% de verbascosídeo das raízes de *Sideritis trojana*, enquanto nas partes aéreas de *Verbascum xanthophoeniceum* foi encontrado 0,25% deste composto (GEORGIEV et al., 2011a). A porcentagem de verbascosídeo pode variar entre as espécies de planta do mesmo gênero, como podemos observar em *Verbascum phoeniceum* e *Verbascum nigrum* que apresentaram 0,2% e até 0,3% desse composto (GEORGIEV et al., 2011b).

Diversas plantas utilizadas na medicina popular possuem em sua composição química o verbascosídeo, que possui ação anti-inflamatória, antibacteriana e cicatrizante. (GEORGIEV et al., 2011a). Hausmann e colaboradores (2007) e Lenoir e colaboradores (2011), demonstraram que o verbascosídeo melhorou significativamente os níveis histológicos e os sintomas clínicos de colite através do modelo experimental de inflamação intestinal.

Potapovich e colaboradores (2013), sugerem que o verbascosídeo (10  $\mu\text{mol}$  por 30s) é capaz de inibir a segunda fase de respostas inflamatórias e metabólicas à irradiação solar UV em queratinócitos humanos. Estudos demonstraram que este composto e outros feniletanoides possuem propriedades citoprotetoras devido às

atividades antioxidantes, e reguladoras positivas de sistemas de desintoxicação endógenas (SGARBOSSA et al., 2012).

No que se refere a atividade antitumoral, o verbascosídeo demonstra a capacidade de inibir a angiogênese no modelo *in vitro* de corpo embrião, induz a diferenciação e apoptose de células de carcinoma gástrico humano e repara danos de DNA ocasionado por estresse oxidativo (LI et al., 2000; ZHANG et al., 2002; WARTENBERG et al., 2003).

Os resultados de atividade anti-inflamatória, avaliação de produção de óxido nítrico (NO) induzido por Lipopolissacarídeo (LPS, *Escherichia coli* 055: B5), ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) 40  $\mu$ M e teste de fototoxicidade 3T3 NRU *in vitro*, contribuem com evidências que o verbascosídeo possui potencial para tornar-se um fármaco experimental visando o tratamento de pacientes acometidos por esta patologia.

4. CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE  
*Plantago australis* E *Plantago major*, E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS

Artigo em preparação



A cromatografia é uma técnica físico-química utilizada na separação, purificação e/ou identificação de misturas de compostos químicos, sendo um dos métodos analíticos mais usados para qualificação e quantificação (MALDANER, 2009). Esta técnica está baseada nas diferenças de polaridades das substâncias presentes na mistura, desse modo a interação com a fase móvel e a fase estacionária será diferente devido a afinidade da molécula com as fases imiscíveis quando uma amostra for injetada na coluna (MALDANER, 2009).

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) é uma técnica analítica capaz de identificar (qualificar) e dosar (quantificar) compostos com diferentes características de absorção de luz ou cores distintas. A CCDAE é um método avançado de cromatografia em camada delgada (CCD) (PRIYAMVADA, et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método analítico mais desenvolvido, disseminado e aplicado nas rotinas em laboratórios de diversos setores ligados a pesquisa, ciências e saúde e, desse modo, as análises tornaram-se mais rápidas sem comprometer o desempenho cromatográfico (JIN et al., 2008; MALDANER, 2009). Para isso, optou-se pela diminuição do tamanho das partículas da fase móvel e das colunas, contudo isso causou a elevação da pressão (MALDANER, 2009). O uso de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  com sistemas de alta pressão foram desenvolvidos e denominado de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (JIN et al., 2008; MALDANER, 2009).

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 61 – 82, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição do desenvolvimento de método para otimização da extração e quantificação das amostras de *Plantago australis* Lam. e *Plantago major* L. e perfil cromatográfico adquiridos por CLAE e CLUE. Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada de alta eficiência – CCDAE das amostras coletadas das espécies mencionadas.









































5. CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E  
VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRA  
EFICIÊNCIA (CLUE)

Artigo em preparação



O processo de extração de metabólitos secundários é uma etapa fundamental no processo de validação de método analítico. Alguns exemplos de fatores que influenciam na extração estão relacionados a solventes e sua concentração, granulometria do material vegetal, tempo de extração, relação droga e solvente, temperatura e número de extrações, entre outros (SASIDHARAN et al., 2011). A otimização destes fatores é imprescindível para que os extratos obtidos possuam a maior quantidade do analíto (s) de interesse. Para isso, o delineamento experimental é um método estatístico utilizado no planejamento de experimentos e análise dos dados encontrados (ALMEIDA et a., 2018).

Os desenhos de triagem são ferramentas utilizadas para controlar e avaliar as influências mais significativas das variáveis dos fatores investigados e suas interações. Os experimentos podem ser preparados usando desenhos fatoriais de dois níveis, total ( $2^k$ ) ou fracionado ( $2^{k-1}$ ), assim variando os níveis dos fatores simultaneamente, em vez de individualmente, é possível identificar as interações entre os fatores (MINITAB 17, 2019).

Metodologias de Superfície de Resposta (MSR) são técnicas de planejamento de experimentos muito usadas em diversos seguimentos para compreender e otimizar a resposta. Os principais experimentos de superfície de resposta são os de Desenho Composto Central, que permite estimar curvas através dos experimentos fatoriais completos ou fracionados com pontos centrais, acrescentando de um grupo de pontos axiais; e os de Box-Behnken, onde as combinações de tratamentos encontram-se nos pontos médios das bordas e requer, no mínimo, três fatores ininterruptos (MINITAB 17, 2019).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), divulgado pelo Ministério da Saúde (2009), orientar estudos e pesquisas que possam contribuir para a elaboração de fitoterápicos disponíveis para utilização da população. Dentre as drogas vegetais relacionadas nesta lista encontra-se *Plantago major*. As pesquisas nos compêndios oficiais não identificaram um método de extração validado para as espécies objeto deste estudo.

Diante disso, a validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes da International Conference on Harmonization (ICH 2005) e a Resolução nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O método foi validado

considerando os parâmetros especificidade/seletividade, linearidade, efeito matriz, repetibilidade (intra-dia), precisão intermediária (inter-dia), exatidão e robustez.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 86 – 115, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da otimização de extração, desenvolvimento e validação de método por cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE).



























































## 6. REFERÊNCIAS



ABUD, M.A.; MOLINA, A.; WENDEL, G.H.; JUAN HIKAWCZUK, V.E.; PELZER, L.E.; MARÍA, A.O.; SAAD, J.R. Gastroprotective effects of *Plantago major* and metabolites in rats. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2012. 31(8): 1203-1206.

ACHATA, M.E.H.; QUIROZ, J.R.R. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales peruanas de 3 departamentos del Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú; 2005.

ADOM, M.B.; TAHER, M.; MUTALABISIN, M.F.; AMRI, M.S.; KUDOSA, M.B.A.; SULAIMANB, M.W.A.W.; SENGUPTA, P.; SUSANTI, D. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. 96: 348–360.

ALBACH, D.C.; MEUDT, H.M.; OXELMAN, B. Piecing together the “new” Plantaginaceae. *American Journal of Botany*. 2005. 92: 297-315.

ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; TSITSA-TSARDIS, E.; HARVALA, C.; TSAKNIS, I.; LALAS, S.; HAROUTOUNIAN, S. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 51: 7308-7312.

ALPIEVA, K.; KORKINA, L.; ORHAN, I.E.; GEORGIEV, M.I. Verbascoside – A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*. 2014. 32(6): 1065-1076.

ALMEIDA, F.A.; GOMES, G.F.; PAULA, V.R.; CORRÊA, J.E.; PAIVA, A.P.; GOMES, J.H.F.; TURRIONI, J.B. A weighted mean square error approach to the robust optimization of the surface roughness in an AISI 12L14 free-machining steel-turning process. *Journal of Mechanical Engineering*. 2018, 64(3): 147-156.

AL-MAMUN, M., SHIBUYA, K., KAJITA, M., TAMURA, Y., SANO, H. Responses of plasma glucose metabolism to exogenous insulin infusion in sheep-fed forage herb plantain and exposed to heat. *Animal*. 2017.11(8), 1287-1294.

ALTANLAR, N.; ÇITOĞLU, G.S.; YILMAZ, B.S. Antilisterial activity of some plants used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*. 2006. 44(2): 91-94.

AMINI, M.; KHERAD, M.; MEHRABANI, D.; AZARPIRA, N.; PANJEHSHAHIN, M.R.; TANIDEH, N. Effect of *Plantago major* on burn wound healing in rat. *Journal of Applied Animal Research*. 2010. 37(1): 53-56.

ANDARY, C.; WYDLE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of verbascoside and orobanchoside caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistate*. *Phytochemistry*. 1982. 21: 1123-1127.

ANDARY, C.; MOTTE-FLORAC, M.E; GARGADENNEC, A.; WYLDE, R.; HEITZ, A. Les esters caféiques du genre *Plantago*. Identification et valeur chimiotaxinomique. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. 1988. 22: 17-22.

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

ATTA, A.H.; NASR, S.M.; MOUNEIR, S.M. Potential protective effect of some plant extracts against carbon tetrachloride - Induced hepatotoxicity. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2006. 3(3): 1-9.

BADSHAH, L.; HUSSAIN, F. People preferences and use of local medicinal flora in district Tank, Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. 5(1): 22-9.

BAGHIZADEH, A., DAVATI, A., HEIDARLOO, A.J., EMADI, F., ALIASL, J. Efficacy of *Plantago major* seed in management of ulcerative colitis symptoms: A randomized, placebo controlled, clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2021. 44:101444.

BAIER-FUENTES, H., MERIGÓ, J.M., AMORÓS, J.E. International entrepreneurship: a bibliometric overview. *International Entrepreneurship and Management Journal*. 2019.15, 385-429.

BEDIR, E.; MANYAM, R.; KHAN, I. A. Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L. *Phytochemistry*. 2003. 63(8): 977-983.

BELORIO, M., GÓMEZ, M. Psyllium: a useful functional ingredient in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020. 1–12. Available from <https://doi:10.1080/10408398.2020.1822276>.

BENTHAM, G.; HOOKER, J.D. Plantagineae. In: BENTHAM, G. & HOOKER, J. D. (Eds). *Genera Plantarum*. 1876. 2: 1223-1225.

BRIDEL, M.; CHARAUX, C. L'orobanchine, glucoside nouveau, retiré des tubercules de l'Orobanche rapum Thuill. *Bulletin de la Société Chimique de France*. 1924. 34: 1153-1600.

BIRKOFER, L.; KAISER, C.; THOMAS, U. Acteosid und neoacteosid: Zuckerester aus *Syringa vulgaris*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1968. 23: 1051-1058.

BORODINA, T.N.; RUMSH, L.D.; KUNIZHEV, S.M.; SUKHORUKOV, G.B.; VOROZHTSOV, G.N.; FELDMAN, B.M.; RUSANOVA, A.V.; VASIL`EVA, T.V.; STRUKOVA, S.M.; MARKVICHEVA, E.A. Entrapment of herbal extracts into biodegradable microcapsules. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2008. 2(2): 176-82.

BRAZ, R.; WOLF, L.G.; LOPES, G.C.; DE MELLO, J.C.P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012. 22(5): 1111-1118.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 48 de 16 de março de 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, In: *Diário Oficial da União*, Brasília. 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. RENISUS): lista de plantas medicinais do SUS, 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anterioresagencia-saude/3487->>. Acesso em: 01 jan 2017.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição. Anvisa. 2021. 223.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF. 2017, 141(1):87-89. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=25/07/2017&jornal=1&pagina=87&totalArquivos+128>>. Acesso em: 26 jul 2017.

\_\_\_\_\_. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6ed. Volume 1. Brasília. 2019. 317.

BÜRGER, M.E.; GHEDINI, P.C.; BALDISSEROTTO, B.; PALMEIRO, N.M.S.; ALMEIDA, C.E.; LENZI, C.F.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, C.Q. Effect of *Plantago australis* leaves on different gastric ulcer models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2002. 12: 113-114.

CABRERA, A.L.; ZARDINI, E.M. Manual de la flora dos alrededores de Buenos Aires. Santa Magdalena: ACME Agency. 1978. 2: 576-579.

CÁMBAR, P.J.; ALGER, J.; ALVARADO, C.; ZELAYA, L.; SANTOS, A.; COUSIN, L.; BACUZZI, L. Efectos farmacológicos de los extractos acuosos de hojas de llantén (*Plántago major*). *Revista Médica Hondureña*. 1985. 53(2): 96-103.

CARDOSO, F.C.I., APOLINÁRIO, P.P., BREDER, J.S.C. PARANHOS, T., OLIVEIRA, H.C., POLIDORO, A. D., KUMAKURA, A.R.S.O.; LIMA, M.H. M. A protocol for systematic review of *Plantago major* L. effectiveness in accelerating wound-healing in animal models. *Systematic Reviews*. 2019. 8(1), 337.  
European Pharmacopoeia 6th ed. *Plantaginis lanceolatae folium* - Ribwort plantain. Whole or fragmented, dried leaf and scape of *Plantago lanceolata* L.s.l. 2010 (6.7)

CASTILLO-JUÁREZ, I.; GONZÁLEZ, V.; JAIME-AGUILAR, H.; MARTÍNEZ, G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. 122(2): 402-405.

CAVALCANTE, A.L.F.A. Plantas Medicinais e Saúde Bucal no SUS: Estudo Etnobotânico e de fatores de risco para interação medicamentosa. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba, João. 2010. 210f.

CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*. 2002. 55(1): 53-62.

CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; LIN, C.C. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2003. 31(2): 225-34.

CHOI, E.S.; CHO, S.D.; SHIN, J.A.; KWON, K.H.; CHO, N.P.; SHIM, J.H. *Althaea rosea* Cavanil and *Plantago major* L. suppress neoplastic cell transformation through the inhibition of epidermal growth factor receptor kinase. *Molecular Medicine Reports*. 2012. 6(4): 843-847.

COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; CUNICO, M.M.; RIBEIRO, M.L.; CAMARGO, E.R.; KUSSEN, G.M.B.; NOGUEIRA, K.S.; DALLA COSTA, L.M. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010. 41(2): 304-309.

CORDEIRO, C.H.G. Atividade biológica de gel dentifrício e enxagüatório bucal contendo extratos vegetais. Araraquara, São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 2005.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006. 42(3): 395-404.

DAU, L., SEGADAS-VIANNA, F., ORMOND, W.T. *Plantaginaceae*. In: *Flora ecológica de restingas do Sudeste do Brasil*. 1978. 22: 1-16.

DECAISNE, J. *Plantaginaceae*. In: CANDOLLE, A.L.P.P. de. *Prodromus systematis naturalis*. Treuttel & Wüitz. 1852. 13(1): 693-737.

DE LIMA NETO, D.A. Efeitos cicatrizantes e antimicrobianos das plantas medicinais espécies *Porophyllum ruderale* (Arnica), *Arctium lappa minor* (Bardana) e *Plantago major* (Tanchagem ou Cinco Nervos). Piracicaba, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. 1991.

DE MOURA SPEROTTO, N.D.; STEFFENS, L.; VERÍSSIMO, R.M.; HENN, J.G.; PÉRES, V.F.; VIANNA, P.; CHIES, J.A.B.; ROEHE, A.; SAFFI, J.; MOURA, D.J. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018. 225: 178-188.

DE PAULA, C.C. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e in vivo de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Margaridinha do Campo) e *Macrosiphonia velame* (A. St.-Hil.) Müll. Arg. (Velame Branco). Cuiabá, Mato Grosso: Universidade Federal de Mato Grosso. 2010.

DIAZ, A. M.; ABAD, M. J.; FERNANDEZ, L.; SILVAN, A. M.; DE SANTOS, J.; BERMEJO, P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. *Life Sciences*. 2004. 74(20): 2515-2526.

ELLIS, B.E. Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry*. 1983. 22(9): 1941-1943.

EL-NAGGAR, L.J.; BEAL, J.L. Iridoids. A review. *Journal of Natural Products*. 1980. 43(6): 649-707.

FRANCO, E.A.N., SANCHES-SILVA, A., RIBEIRO-SANTOS, R., DE MELO, N.R. Psyllium (*Plantago ovata* Forsk): From evidence of health benefits to its food application. *Trends in Food Science and Technology*. 2020. 96, 166-175.

FREITAS, A.G.; COSTA, V.; FARIAS, E.T.; LIMA, M.C.A.; SOUSA, I.A.; XIMENES, E.A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2002. 64-65.

FU, G.; PANG, H.; WONG, Y.H. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 2008. 15: 2592-2613.

GEORGIEV, M.I.; ALIPIEVA, K.; ORHAN, I.; ABRASHEV, R.; DENEV, P.; ANGELOVA, M. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry*. 2011a. 128: 100-105.

GEORGIEV, M.I.; ALI, K.; ALIPIEVA, K.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*. 2011b. 72: 2045-2051.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. *Plantago major* L. et *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae). *Phytothérapie*. 2008. 6: 367-371.

GOL'DBERG, E.; AMOSOVA, E.M.; ZUEVA, E.P.; RAZINA, T.G.; KRYLOVA, S.G.; REIKHART, D.V. Effects of extracts from medicinal plants on the development of metastatic process. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004. 138(3): 288-294.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products*. 2016. 83: 213-226.

GONZÁLEZ, M.G.; MORALES, T.C.; RODRÍGUEZ, G.A.S.; PAZOS, L. Toxicidad sub-crónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de *Plantago major* (Plantaginaceae). *Revista de Biología Tropical*. 2003. 51(3-4): 635-638.

GUILLEN, M.E.N.; EMIM, J.A.S.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. *International Journal of Pharmacognosy*. 1997. 35(2): 99-104.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006. 27: 1-93.

HADDADIAN, K; HADDADIAN, K.; ZAHMATKASH, M. A review of *Plantago* plant. *Indian Journal of Tradicional Knowledge*. 2014. 13(4): 681-685.

HAQ, F.; AHMAD, H.; ALAM, M. Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarr catchment (District Battagram), Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. 5(1): 39-48.

HASSEMER, G., BRUUN-LUND, S., SHIPUNOV, A.B., BRIGGS, B.G., MEUDT, H.M., RØNSTED, N. The application of high-throughput sequencing for taxonomy: The case of *Plantago* subg. *Plantago* (Plantaginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019. 138, 156-173.

HAUSMANN, M., OBERMEIER, F., PAPER, D.H., BALAN, K., DUNGER, N., MENZEL, K., FALK, W., SCHOELMERICH, J., HERFARTH, H., ROGLER, G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007.148(2): 373-381.

HE, Z. D.; LAU, K. M.; XU, H. X.; LI, P. C.; BUT, P. P. H. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *Journal Ethnopharmacology*. 2000. 71(3): 483-436.

HE, Z. D.; BUT, P. P. H.; CHAN, T. W. D.; DONG, H.; XU, H. X.; LAU, C. P.; SUN, H. D. Antioxidative Glucosides from the Fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001. 49(6): 780-786.

HEFLER, S.M.; RODRIGUES, W.A; CERVI, A.C. O gênero *Plantago* L. (Plantaginaceae) na região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociência*. 2011. 9(3): 297-321.

HENN, J. G.; STEFFENS, L.; DE MOURA SPEROTTO, N. D.; DE SOUZA PONCE, B.; VERISSIMO, R.M.; BOARETTO, F.B.M.; HASSEMER, G.; PERES, V.F.; SCHIRMER, H.; PICADA, J.N.; SAFFI, J.; MOURA, D.J. Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract from leaves of *Plantago australis* and its major compound, verbascoside, *Journal of Ethnopharmacology*. 2019. 30(229): 145-156.

HETLAND, G.; SAMUELSEN, A.B.; LOSLASH VIK, M.; PAULSEN, B.S.; AABERGE, I.S.; GROENG, E.C.; MICHAELSEN, T.E. Protective effect of *Plantago major* L. pectin

polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2000. 52(4): 348-355.

KHAJAVI, R.A., SHAHRAKI, S., NAJI, E.Y.Z., EBRAHIMZADEH B.A., HEDAYATI, M.M., SAMADI. N.Z., HOSSEINIAN S. *Plantago major* ameliorates adriamycin-induced renal fibrosis via down-regulation of TGF- $\beta$  and collagen IV expression. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A*: 2021. 45(5): 1531-1538.

HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH. *Plantago major*. Deutscher Apotheker Verlag. 2013.

HUSS, U. Studies on the effects of plant and food constituents on cyclooxygenase-2: Aspects in inflammation and cancer. *Acta Universitatis Upsaliensis*. Uppsala. 2003. 56.

JANČIĆ, R. *Botanika farmaceutika* (1st edition) Beograd: Javno preduzeće službenilist. 2002.

JENSEN, S.R. Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1992. 79, 284–302.

JIA, C.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; YANG, J.; XUB, C.; MAO, D. Identification of glycoside compounds from tobacco by high performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion-trap tandem mass spectrometry coupled with electrospray ionization orbitrap mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2017. 28(4): 629-640.

JIMENEZ, C.; RIGUERA, R. Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Natural Product Reports*. 1994. 11: 591-606.

JIN, Y.; XUE, X.; SHI, H.; XIAO, Y.; ZHANG, F.; LIANG, X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*. 2008. 10(1): 80-84.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F. *Plant systematics: a phylogenetic Approach*. Sunderland: Sinauer Associates. 1999. 464.

\_\_\_\_\_. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. *Systematic Biology*. 2002. 2: 576.

KABORE, F.P., PARK, M. Can patent family size and composition signal patent value? *Applied Economics*. Taylor & Francis Journals. 2019. 51(2), 1-21.

KAHRAMAN, C.; TATLI, I.I.; KART, D.; EKİZOĞLU, M.; AKDEMİR, Z.S. Structure elucidation and antimicrobial activities of secondary metabolites from the flowery parts of *Verbascum mucronatum* Lam. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. 15(3): 231-237.

KARAKAŞ, F.P.; YILDIRIM, A.; TÜRKER, A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*. 2012. 36(6): 641-52.

KARTINI, K., WATI, N., GUSTAV, R., WAHYUNI, R., ANGGADA, Y.F., HIDAYANI, R., RAHARJO, A., ISLAMIE, R., PUTRA, S.E.D. Wound healing effects of *Plantago major* extract and its chemical compounds in hyperglycemic rats. *Food Bioscience*. 2021. 41:100937.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; ARIBURNU, E.; MASULLO, M.; FESTA, M.; CAPASSO, A.; YESILADA, E.; PIACENTE, S. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia*. 2012. 83: 130-136.

KRASNOV, M.S.; MARGASIUK, D.V.; IAMSKOV, I.A.; IAMSKOVA, V.P. The effect of extremely low doses of the novel regulatory plant proteins. *Radiation Biology Radioecology*. 2003. 43(3): 269-272.

KRASNOV, M.S.; YAMSKOVA, V.P.; MARGASYUK, D.V.; KULIKOVA, O.G.; IL'INA, A.P.; RYBAKOVA, E.Y.; IAMSLOV, I.A. Study of a new group of bioregulators isolated from the greater plantain (*Plantago major* L.). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. 47(2): 128-35.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012. 4(3): 101-112.

LENOIR, L.; ROSSARY, A.; JOUBERT-ZAKEYH, J.; VERGNAUD-GAUDUCHON, J.; FARGES, M.C.; FRAISSE, D.; TEXIER, O.; LAMAISON, J.L.; VASSON, M.P.; FELGINES, C. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Digestive Diseases and Sciences*. 2011. 56(12): 3534-3545.

LI, Y.M.; HAN, Z.H.; JIANG, S.H.; JIANG, Y.; YAO, S.D.; ZHU, D.Y. Fast repairing of oxidized OH radical adducts of dAMP and dGMP by phenylethanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2000. 21: 1125-1128.

LI, L.; TSAO, R.; LIU, Z.; LIU, S.; YANG, R.; YOUNG, J.C.; ZHU, H.; DENG, Z.; XIE, M.; FU, Z. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium*. *Journal of Chromatography*. 2005. 1063(1-2): 161-169.

LIN, L.T.; LIU, L.T.; CHIANG, L.C.; LIN, C.C. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research*. 2002. 16(5): 440-444.

LIN, C.C.; CHENG, H.Y.; FANG, B.J. Anti-herpes virus type 2 activity of herbal medicines from Taiwan. *Pharmaceutical Biology*. 2003. 41(4): 259-262.

LITHANDER, A. Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumour Biology*. 1992. 13(3): 138-141.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*. 2009. 32(1): 214-222.

MCCUTCHEON, A.R.; ELLIS, S.M.; HANCOCK, R.E.W.; TOWERS, G.H.N. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*. 1994. 44(3): 157-169.

MEDEIROS-NEVES, B., NEMITZ, M.C., FACHEL, F.N.S., TEIXEIRA, H.F. Recent Patents Concerning the Use of Nanotechnology-Based Delivery Systems as Skin Penetration Enhancers. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2019. 13, 192-202.

MEIRELLES, G.C., BRIDI, H., VON POSER, G.L., NEMITZ, M.C. Hypericum species: An analysis on the patent Technologies. *Fitoterapia*. 2019. 139, 104363.

METINER, K.; ÖZKAN, O.; SEYYAL, A.K. Antibacterial effects of ethanol and acetone extract of *Plantago major* L. on gram positive and gram negative bacteria. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2012. 18(3): 503-505.

MICHAELSEN, T.E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A.B.; HØGÅSEN, K.; PAULSEN, B.S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2000. 52(5): 483-490.

MINITAB 17. Tabela Análise de Variância de Analisar um experimento fatorial. Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/factorial/analyze-factorial-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table>>. Acesso em: 01 out 2019.

MIRALDI, E.; FERRI, S.; MOSTAGHIMI, V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*. 2001. 75(2-3): 77-87.

MIRONOV, V.A.; VASIL'EV, G.S.; MATROSOV, V.S.; FILIPOVA, T.M.; ZAMUREENKO, V.A.; MISHCHENKO, V.V.; MAIRANOYSKII, V.G.; FEL'DSHTEIN, M.A. Physiologically active alcohols from great plantain (*Plantago major*). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1984. 17(11): 794-798.

MIRZAEI, A.; MIRZAEI, N.; MIRZAEI, M.; GHAREMANIFAR, M. Cytotoxicity assessment by *Artemia urmiana* in some indigenous medicinal plants in Iran. *Clinical Biochemistry*. 2011. 44(13): S119.

MØLGAARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*. 1988. 27: 2411-2421.

MUKAKA, M.M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*. 2012. 24(3), 69-71.

NAJMI, A.K.; PILLAI, K.K.; PAL, S.N.; AQIL, M. Free radical scavenging and hepatoprotective activity of jigrine against galactosamine induced hepatopathy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 97(3): 521-525.

NEMITZ, M.C., ARGENTA, D.F., KOESTER, L.S., BASSANI, V.L., VON POSER, G.L., TEIXEIRA, H.F. The international scenario of patents concerning isoflavones. *Trends in Food Science & Technology*. 2019. 49, 85-95.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012. 75(3): 311-35.

NISHIMURA, H.; YAMAGUCHI, T.; SASAKI, H.; MOROTA, T.; YANAGISAWA, T.; SATO, T.; CHIN, M.; MITSUHASHI, H. Enzyme inhibitory activities of phenethyl alcohol glycosides from *Rehmannia glutinosa*. *Planta Medica*. 1990. 56: 684.

NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Bitter phenylpropanoid glycosides from *Conandron ramoidioides*. *Phytochemistry*. 1977. 16: 1265-1267.

NUMATA, A.; NABAE, M.; YAMAMOTO, K.; YAMAMOTO, E.; MATSUMURA, E.; KAWANO, T.; PETTIT, G. Assignment of quaternary carbons in aromatic compounds by long-range heteronuclear shift correlated 2D-NMR spectroscopy and its application to acteoside. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987. 51(4): 1199-1201.

OLIVIER, D.K.; SHIKANGA, E.A.; COMBRINCK, S.; KRAUSE, R.W.M.; REGNIER, T.; DLAMINI, T.P. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. *South African Journal of Botany*. 2010. (76): 58-63.

OLIVEIRA, E.R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte - MG. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2012. 14(2): 311-320.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. World Health Organization: Geneva. 2009.

\_\_\_\_\_. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva: WHO, 2013.

OSOSKI, A.L.; LOHR, P.; REIFF, M.; BALICK, M.J.; Kronenberg, F.; Fugh-Berman, A.; O'Connor, B. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. 79(3): 285-298.

OZASLAN, M.; KARAGÖZ, I.D.; KALENDER, M.E.; KILIC, I.H.; SARI, I.; KARAGÖZ, A. In vivo antitumoral effect of *Plantago major* L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich ascites tumor. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2007. 35(5): 841-851.

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I.D.; KILIG, I.H.; CENGIZ, B.; KALENDER, M.E.; GIILDIIR, M.E.; KARAGÖZ, A.; ZÜMRÜTDAL, M.E. Effect of *Plantago major* sap on Ehrlich ascites tumours in mice. *African Journal of Biotechnology*. 2009. 8(6): 955-959.

PALMEIRO, N.M.S.; ALMEIDA, C.E.; GHEDINI, P.C.; GOULART, L.S. Evaluation of the acute toxicity of the aqueous crude extract of leaves of *Plantago australis* Lam. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2002a. 15: 15-17.

PALMEIRO, N.M.S.; ALMEIDA, C.E.; GHEDINI, P.C.; GOULART, L.S.; BALDISSEROTTO, B. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Plantago australis* hydroalcoholic extract. *Acta Farmacêutica Bonaerense*. 2002b. 21(2): 89-92.

PALMEIRO, N.M.S.; ALMEIDA, C.E.; GHEDINI, P.C.; GOULART, L.S.; PEREIRA, M.C.F.; HUBER, S.; SILVA, J.E.P.; LOPES, S. Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003. 88: 15-18.

PHARMACOPÉE FRANÇAISE. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. *Plantago major* for homoeopathic preparations. 2007. Disponível em: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/dfdf45622af62d69d5ad2923568a4698.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/dfdf45622af62d69d5ad2923568a4698.pdf)>. Acesso em: 15 fev 2017.

PLANTAGINACEAE. The Plant List, 2013. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Plantaginaceae/>>. Acesso em: 26 de set. de 2021.

PARGAS, A.R.; PADILLA, M.C.L.; RODRIGUEZ, A.H.; BARRANCO, J.J. Prueba de irritabilidad dérmica primaria del *Plantago major*. *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s. 1996.1(3): 46.

PARRA, A.I.; CAPÓ, J.T.; MONTALVO, R. v.; GONZÁLEZ Y.C. Toxicidad aguda oral de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s. 1999. 1(4): 26-28.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001. 8(5): 395-400.

PETKEVICIUTE, Z.; SAVICKIENE, N.; SAVICKAS, A.; BERNATONIENE, J.; SIMAITIENE, Z.; KALVENIENE, Z.; PRANSKUNAS, A.; LAZAUSKAS, R.; MEKAS, T.A. Urban ethnobotany study in Samogitia region, Lithuania. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. 4(1): 64-71.

PILGER, R. *Plantaginaceae* In: ENGLER, A. *Das Pflanzenreich*. Neudruck: Verlag von H. R. Engelmann. 1937. 466.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): an overview of systematic reviews. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2013. 69: 295-307.

POTAPOVICH, A.I.; KOSTYUK, V.A.; KOSTYUK, T.V.; DE LUCA, C.; KORKINA, L.G. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research*. 2013. 62: 773-780.

PRIYAMVADA, S.; SRINIVAS, B.; PRATIMA, M. Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers. *Indian Journal of Medical Research*. 2010; 132: 201-208.

RAHAMOOZ, H.S., BAGHERI, K., DANAFAR, H., SHARAFI, A. Anti-proliferative properties, biocompatibility, and chemical composition of different extracts of *Plantago* major medicinal plant. *Iranian Biomedical Journal*. 2021. 25(2): 106-116.

RAHN, K. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1966. 120: 145-198.

\_\_\_\_\_. *Plantago* section *Virginica*. *Dansk Botanisk Arkiv*. 1974. 30(2): 1-180.

\_\_\_\_\_. Plantaginaceae. In: BURKART, A. *Flora Illustrada de Entre Rios Buenos Aires: I.N.T.A.* 1979. 5: 583-591.

\_\_\_\_\_. Plantaginaceae. In: HUNZIKER, A.T. (Ed.). *Flora fanerogámica Argentina*. Argentina: Proflora-Conicet. 1995. 3: 1-24.

\_\_\_\_\_. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1996. 120: 145-198.

RAUBER, C. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos wistar. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

RAZIK, B.M.A.; HASAN, H.A.; MURTADHA, M.K. The study of antibacterial activity of *Plantago major* and *Ceratonia siliqua*. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal*. 2012. 11(1): 130-135.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*. 1998. 61(10): 1212-1215.

RINGBOM, T.; HUSS, U.; STENHOLM, A.; FLOCK, S.; SKATTEBØL, L.; PERERA, P.; BOHLIN, L. COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of Natural Products*. 2001. 64(6): 745-749.

RODRIGUEZ, M.T.B.; PEREZ-SAAD, H. *Plantago major* L. (Llanten) y epilepsia I. Efecto de las decocciones de hojas y raíces sobre el foco penicilínico en ratas curarizadas. *Revista Cubana de Plantas Medicinables*. 1996. 1(1): 34-36.

RØNSTED, N., GÖBEL, E., FRANZYK, H., JENSEN, S.R., OLSEN, C.E. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*. 2000. 55(4): 337–348.

RØNSTED, N., FRANZYK, H., MØLGAARD, P., JAROSZEWSKI, J.W., JENSEN, S.R. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*. 2003. 242: 63-82.

ROSLON, W., GONTAR, L., KOSAKOWSKA, O., OSIŃSKA, E. Yield and quality of plantain (*Plantago major* L.) herb in the second year of cultivation. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – Horticulture and Landscape Architecture*. 2015. 36, 21-32.

ROTHER, E.T. Systematic x Narrative Review. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2007. 20(2), V-VI.

RUIZ, A.R.; DE LA TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996. 52(3): 123-127.

SAGANUWAN, A.S. Some medicinal plants of Arabian Penninsula. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. 4(9): 766-788.

SAIMARU H.; ORIHARA, Y. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal of Natural Medicines*. 2010. 64(20): 139-145.

SAKURAI, A.; KATO, T. A new glycoside, kusagin in isolated from *Clerodendron trichotomum*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1983. 56: 1573-1574.

SAMUELSEN, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. 71: 1-21.

SANZ-BISET, J.; CAMPOS-DE-LA-CRUZ, J.; EPIQUIÉN-RIVERA, M.A.; CAÑIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. 122(2): 333-62.

SASAKI, H.; NISHIMURA, H.; MOROTA, T.; CHIN, M.; MITSUHASHI, H.; KOMATSU, Y.; MARUYAMA, H.; GUO-RUI, T.; WEI, H.; YU-LANG, X. Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*1. *Planta Medica*. 1989. 55(5): 458-462.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2011. 8(1): 1–10.

SAVIKIN, K.; ZDUNIC, G.; MENKOVIC, N.; ZIVKOVIC, J.; CUJIC, N.; TERESCENKO, M.; BIGOVIC, D. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-

Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013. 146(3): 803-810.

SCARPATI, M.L.; DELLE MONACHE, F. Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Annali di Chimica (Rome)*. 1963. 53: 356-367.

SEZIK, E.; YEŞİLADA, E.; HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001. 75(2-3): 95-115.

SGARBOSSA, A.; DAL BOSCO, M.; PRESSI, G.; CUZZOCREA, S.; DAL TOSO, R.; MENEGAZZI, M. Phenylethanoid glycosides from plant cell cultures induce heme oxygenase 1 gene expression in a human keratinocyte cell line by affecting the balance of NRF2 and BACH1 transcription factors. *Chemico-Biological Interactions*. 2012. 199: 87-95.

SHAH, B.; SETH, A. *Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Haryana: Elsevier. 2010. 1. ed.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; SANTOS, E. V. M.; ALMEIDA, J. M. L. *Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento. 2000. 23-25 e 146-149.

SHIPOCHLIEV, T., DIMITROV, A., ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Veterinarno-meditsinski Nauki*. 1981. 18(6): 87-94.

SICK, N., MERIGÓ, J.M., KRÄTZIG, O., LIST, J. Forty years of World Patent Information: A bibliometric overview. *World Patent Information*. 2021. 64, 102011.

SOUZA, J.P.; SOUZA, V.C. Plantaginaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo. 2002. 2: 225-228.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 2 ed.

SOUZA, V.C.; HASSEMER, G. Plantaginaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB191>. Acesso em: 25 mai 2018.

STEYNBERG, J.P.; BRANDT, E.V.; BURGER, J.F.W.; BEZUIDENHOUDT, B.C.B.; FERREIRA, D. Stilbene glycosides from *Guibourtia coleosperma*: determination of glycosidic connectivities by homonuclear overhauser effect differences spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1988. 1: 37-42.

STENHOLM, A.; GÖRANSSON, U.; BOHLIN, L. Bioassay-guided supercritical fluid extraction of cyclooxygenase-2 inhibiting substances in *Plantago major* L. *Phytochemical Analysis*. 2013. 24(2): 176-183.

STOJANOVIC, G. Experimental study of the effect of the phytomixture made of leaves of *Plantago major* L. and *Achillea millefolium* L. on the secretion activity of the stomach in dogs. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2005. (4): 73-76, 113.

SUNG, S. H.; KIM, E. S.; LEE, K. Y.; LEE, M. K.; KIM, Y. C. A new neuroprotective compound of *Ligustrum japonicum* leaves. *Planta Medica*. 2006. 72(1): 62-64.

TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. Studies on the Constituents of *Leonotis nepetaefolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999. 47(2): 284-286.

TASKOVA, R.M.; GOTFREDSEN, C.H.; JENSEN, S.R. Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (Plantaginaceae). *Phytochemistry*. 2005. 66: 1440-1447.

THOMÉ, R.G.; DOS SANTOS, H.B.; DOS SANTOS, F.V.; DA SILVA OLIVEIRA, R.J.; DE CAMARGOS, L.F.; PEREIRA, M.N.; LONGATTI, T.R.; SOUTO, C.M.; FRANCO, C.S.; SCHÜFFNER, R.O.A.; RIBEIRO, R.I. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. *Experimental Biology and Medicine*. 2012. 237(12): 1379-1386.

TIAN, X.-Y., LI, M.-X., LIN, T., QIU, Y., ZHU, Y.-T., LI, X.-L., TAO, W.-D., WANG, P., REN, X.-X., CHEN, L.-P. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021. 209, 112563.

TOLABA, S.A. & FABBRONI, M. Flora del Valle de Lerma - Plantaginaceae. *Aportes Botânicos de Salta - ser. Flora*. 1998. 5(5): 1-31.

TROPICOS. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/40010301>>. Acesso em: 22 set 2019.

ÜNSAL, Ç.; VURAL, H.; SARIYAR, G.; ÖZBEK, B.; ÖTÜK, G. Traditional medicine in Bilecik province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Turkey Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. 7(2): 139-150.

UZUN, E.; SARIYAR, G.; ADSERSEN, A.; KARAKOC, B.; OTÜK, G.; OKTAYOGLU, E.; PIRILDAR, S. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. 95(2-3): 287-296.

VARGAS NETO P. Ação antifúngica de plantas medicinais e da própolis frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Ponta Grossa, Paraná: Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2004.

VELASCO-LEZAMA, R.; TAPIA-AGUILAR, R.; ROMÁN-RAMOS, R.; VEGA-AVILA, E.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, M.S. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. 103(1): 36-42.

VON POSER, G.L.; JSCHRIPSEMA, J.; OLSEN, C.E.; HENRIQUE, A.T.; JENSEN, S.R. 2'-Apiosylgardoside, an iridoid glucoside from *Verbenoxylum reitzii*. *Phytochemistry*. 1998. 49(5): 1471-1473.

XUE, Z., YANG, B. Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules*. 2016. 21(8), 991.

WANG, F.; ZHI, J.; ZHANG, Z.; WANG, L.; SUO, Y.; XIE, C.; LI, M.; ZHANG, B.; DU, J.; GU, L.; SUN, H. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq Technique for Identification of Genes Involved in Acteoside Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*. 2017. 8: 787.

WANG, H., ZHOU, X-M., WU, L-Y., LIU, G-J., XU, W-D., ZHANG, X-S., GAO, Y-Y., TAO, T., ZHOU, Y., LU, Y., WANG, J., DENG, C-L., ZHUANG, Z., HANG, C-H., LI, W. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2020. 17(1), 188.

WARTENBERG, M.; BUDDE, P.; DE MAREES, M.; GRUNHECK, F.; TSANG, S.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y.; HESCHELLER, J.; SAUER, H. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation culture of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional Chinese medicine. *Laboratory Investigation*. 2003. 83: 87-98.

WIPO. World Intellectual Propriety Organization. A China torna-se o primeiro requerente de patentes internacionais em 2019, em contexto de sólido crescimento dos serviços de PI, de tratados e finanças da OMPI. 2020. 15 p.

WU, L., GEORGIEV, M.I., CAO, H., NAHAR, L., EL-SEEDI, H.R., SARKER, S.D., XIAO, J. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Medicinal Research Reviews*. 2020. 40(6), 2605-2649.

WURTZEL, E.T., KUTCHAN, T.M. 2016. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. *Science*. 353(6305): 1232-6.

YANG, C., SHI, Z., YOU, L., DU, Y., YAN, J.N.D. Neuroprotective effect of catalpol via anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*. 2020.n11, 690.

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI, L.J.; RAMOS, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 1999. 41(2): 59-62.

ZENG, X., GUO, F., OUYANG, D. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. *Fitoterapia*. 2020. 140, 104443.

ZHANG, F.; JIA, Z.; DENG, Z.; WEI, Y.; ZHENG, R.; YU, L. In vitro modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside. *Planta Medica*. 2002. 68: 115-118.

ZHANG, H. Bioactive Natural products: detection, isolation, and structural determination. *Phytomedicine*. 2011. 18(10): 902-903.

ZUBAIR, M.; NYBOM, H.; LINDHOLM, C.; RUMPUNEN, K. Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Scientia Horticulturae*. 2011. 128: 523-529.

ZUBAIR, M., EKHOLM, A., NYBOM, H., RENVERT, S., WIDEN, C., RUMPUNEN, K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012a. 141(3): 825-830.

ZUBAIR, M.; NYBOM, H.; AHNLUND, M.; RUMPUNEN, K. Detection of genetic and phytochemical differences between and within populations of *Plantago major* L. (plantain). *Scientia Horticulturae*. 2012b. 136: 9-16.

ZUBAIR, M., WIDÉN, C., RENVERT, S., RUMPUNEN, K. Water and ethanol extracts of *Plantago major* leaves show anti-inflammatory activity on oral epithelial cells. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2019. 9(3): 169-171.

ÇİTOĞLU, G.S.; ALTANLAR, N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2003. 32(3): 159-163.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS



O expressivo e crescente uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas enfermidades, bem como a introdução no mercado farmacêutico de drogas vegetais e fitoterápicos, devem ser vistos de maneira prudente. A utilização excessiva e inadvertida de plantas medicinais pode gerar danos à saúde para o paciente, principalmente pela toxicidade.

A investigação científica de plantas medicinais visando divulgar dados confiáveis e precisos envolvendo as atividades terapêuticas e segurança na sua utilização é de grande relevância.

A busca de métodos para o controle de qualidade de plantas medicinais é essencial e deve abranger todas as etapas que envolvem a seleção da espécie, como: identificação, coleta planejada que respeite o período de desenvolvimento da planta, secagem com temperatura controlada, descarte de matéria estranha e armazenamento apropriado. Dessa forma, o produto final deve atender aos requisitos de qualidade e teores de princípio ativos adequados.

O gênero *Plantago* possui diversas espécies como *P. australis* e *P. major*, utilizadas na medicina popular principalmente como agentes anti-inflamatório, antibacteriano e cicatrizante. As espécies são confundidas entre si devido a sua semelhança o que leva a serem conhecidas pelos mesmos nomes populares, transagem, tansagem e língua-de-vaca. Diante disso, a análise botânica e identificação são importantíssimas para a diferenciação das espécies, bem como a relevância dos parâmetros de qualidade propostos.

A cromatografia a líquido de alta eficiência é uma ferramenta para analisar qualitativa e quantitativamente extratos de drogas vegetais e determinar a concentração de um marcador químico. Diversos métodos descritos na literatura foram testados para as espécies em análise, porém nenhum se mostrou reprodutível. Alguns percalços relacionados a má resolução do pico dos compostos ocorreram durante o desenvolvimento do método para caracterização do perfil fitoquímico. A acidificação da fase móvel resultou na melhora da resolução e simetria dos picos.

As análises dos compostos isolados do fracionamento do extrato etanólico e metanólico das folhas de *P. australis*, foram realizadas por CLAE/UV utilizando SQT. Os compostos isolados foram caracterizados como o iridoide glicosilado aucubina (**composto 1**) e o feniletanoide glicosídico verbascosídeo (**composto 2**). O

isolamento resultou em 0,094 g (0,2%) de aucubina (1) e 0,209 g (1,31%) de verbascosídeo (2) em relação a massa da planta (Capítulo 1).

A análise dos cromatogramas de CLUE/UV das amostras das espécies de *P. australis* e *P. major* demonstraram similaridade entre os perfis cromatográficos. Contudo, a presença de um pico no tempo de 5,913 min de *P. major* confere a autenticidade da espécie, sendo que sua ausência sugere a adulteração da droga vegetal (Capítulo 1).

A densitometria por CCDAE é uma técnica eficiente e precisa para a determinação do perfil cromatográfico de drogas vegetais. Os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das amostras de *P. australis* e *P. major* obtidos por CCDAE com o eluente acetato de etila: água: ácido acético: ácido fórmico (110:20:11:11), visualizado em UV 365 nm e revelado com NP/PEG 400, mostram o marcador químico verbascosídeo com  $R_f \pm 0,77$ . Assim, essas condições de análise mostraram-se adequadas para identificação de feniletanoides nos extratos das espécies de *Plantago*. A comparação do espectro UV adquirido por CLUE e por densitometria mostra que os picos em tR 4,62 min e as zonas fluorescentes laranja e azul em  $R_f \pm 0,55$  pertencem a compostos das classes feniletanoides e flavonoides. (Capítulo 1).

A determinação de perda por dessecação do pó das folhas sugere eficiência durante o processo de secagem e a estabilidade do material. Os teores de umidade encontrados nas folhas de *P. australis* foram de 6,99 a 9,37%. No caso de *P. major*, variaram de 6,9 a 8,81% quando ocorreu o processo de estabilização (Capítulo 1).

O método de extração por refluxo desenvolvido para a quantificação de verbascosídeo nas espécies de *P. australis* e *P. major* por CLUE/UV demonstrou que todos os resultados de seletividade, linearidade, limites de detecção e limites de quantificação, efeito matriz, repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), exatidão, robustez e adequabilidade do sistema são satisfatório e em conformidade com as exigências definidas na Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (Capítulo 2).

8. ANEXO 1 – ARTIGO – HERBAL PRODUCTS OF *Plantago* SPECIES:  
INTERNATIONAL PATENTS SURVEY

Artigo publicado – Journal of Herbal Medicine 36 (2022) 100603 -  
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100603>



O gênero *Plantago*, membro da família Plantaginaceae, compreende 414 espécies anuais e perenes distribuídas em todo mundo, principalmente em regiões temperadas. No Brasil, ocorrem principalmente em regiões trocais da região Sul e Sudeste. Dentre as 22 espécies representadas, *P. australis* Lam., *P. lanceolata* L., *P. major* L., *P. tomentosa* Lam. são as mais comumente encontradas. As espécies de *Plantago* possuem aproximadamente 40 cm de altura; com folhas que variam de ovaladas, elípticas ou ovaladas e inflorescências em forma de espigas alongadas ou cilíndricas contendo pequenas flores. Dentre os compostos químicos de importância farmacológica presentes nas espécies de *Plantago* podemos citar os carboidratos, flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos e principalmente feniletanoides glicosídicos e iridoides glicosilados (RAHN, 1966, JANČIĆ, 2002, SOUZA & SOUZA, 2002; RØNSTED et al., 2003, HADDADIAN et al., 2014, SOUZA, 2015, TROPICOS, 2019).

O uso terapêutico das espécies de *Plantago* pela medicina tradicional está relacionado aos efeitos anti-inflamatórios, antivirais, cicatrizante, antioxidante, modulador intestinal, dentre outros. Essas propriedades têm interessado os pesquisadores em determinar quais princípios ativos e mecanismo de ação são responsáveis pela atividade biológica (BÜRGER et al., 2002; PALMEIRO et al., 2002b).

Estudos recentes atribuem aos extratos de *P. major* efeitos renoprotetor (Khajavi et al., 2021), cicatrizante, tratamento para refluxo gastroesofágico (Kartini et al., 2021) e sintomas da colite ulcerosa (Baghizadeh et al., 2021).

Rahamooz e colaboradores (2021), avaliaram a atividade dos extratos etanólico, metanólico e acetônico de raízes de *P. major* frente as linhagens celulares HCT-116. Os resultados sugerem que esta espécie possui propriedades antiproliferativas. Extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. major* foram testadas *in vitro* usando a linhagem celular epitelial oral H400. Os resultados demonstraram que na concentração de 1,0 mg/mL do extrato etanólico ou na combinação com o extrato aquoso e etanólico das folhas desta planta podem promover a proteção contra mediadores inflamatórios (Zubair et al., 2019).

Destacamos, por exemplo, a importância do *Plantago ovata* Forssk (psyllium) para a indústria nutracêutica e farmacêutica devido a propriedade mucilogênica presente na casca da semente, responsável pelo efeito de regulação intestinal.

Proteger uma invenção ou tecnologia, através de uma patente, pode conferir o monopólio de exploração à uma empresa. No setor farmacêutico uma patente pode estar relacionada a uma composição ou forma farmacêutica, um processo de fabricação, um composto isolado com atividade farmacológica, dentre outros. As patentes farmacêuticas devem cumprir os requisitos de inovação, atividade criativa e aplicabilidade industrial.

A pesquisa por patentes, utilizando bases de dados tais como PCT e espacenet, envolvendo produtos e/ou processos com base em espécies de *Plantago* permite encontrar informações sobre a quantidade de patentes requeridas por ano, país, grupos de inovações e os principais requerentes que buscam a proteção à propriedade intelectual de suas invenções. Esse conhecimento é importante pois estimula a indústria farmacêutica no investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) para a criação de novos medicamentos, alimentos funcionais e suplementos dietéticos.

Os métodos utilizados na pesquisa referente a patentes depositadas envolvendo espécies do gênero *Plantago*, bem como os resultados e a discussão dos mesmos estão apresentados no artigo intitulado “Herbal products of *Plantago* species: international patents survey”, publicado no periódico Journal of Herbal Medicine, que está apresentado a seguir.

ARTIGO – Herbal products of *Plantago* species: International patents  
survey



## HERBAL PRODUCTS OF PLANTAGO SPECIES: INTERNATIONAL PATENTS SURVEY

Maria Helena Vendruscolo<sup>a</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>a</sup>, Amélia T. Henriques<sup>a</sup>, Marina Cardoso Nemitz<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Rio Grande do Sul, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, 2752 Ipiranga Avenue, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Rio de Janeiro, Pharmacy Course, Macaé Campus, Aluizio da Silva Gomes Street, 50, Macaé, Brazil

**\*Corresponding author:** Marina C. Nemitz. Federal University of Rio de Janeiro, Pharmacy Course, Macaé Campus, Aluizio da Silva Gomes Street, 50, Macaé, Brazil. E-mail address: [marinanemitz@yahoo.com.br](mailto:marinanemitz@yahoo.com.br)

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 148 – 172 e 181 – 184.

Maria Helena Vendruscolo, Gilsane Lino von Poser, Amélia Teresinha Henriques, Marina Cardoso Nemitz. 2022. Herbal products of plantago species: international patents survey. *Journal of Herbal Medicine*. v. 36. 100603. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100603>

## Abstract

**Introduction:** The genus *Plantago* (Plantaginaceae) encompasses 250 species distributed worldwide, many of them used in the traditional medicine. Technological advances regarding this genus are constantly being proposed. The target of this study was to carry out a patent survey of *Plantago*-based products and processes. **Methods:** The search was performed in the Espacenet® patent database, limiting the period from 1999 to 2019 and using the terms "*Plantago*" or "plantain herb" in the title. **Results:** A total of 216 patents available were divided into groups: health care (50%), biotechnology (7%) and other subjects (47%). The majority of patent applicants are from China (52%), Korea (South) (23%) and Germany (6%). The documents were filed by companies (45%), independent applicants (38%) or universities (17%). In the health group, which includes half of the total patents, 25% of them are related to the food field, 63% to the phytotherapy field, 11% to the phytotherapy/food field and 1% to the cosmetics field. The phytotherapy subgroup has been deeply analyzed and mainly describes the use of *Plantago asiatica*, *Plantago major*, and plantain herb (a term used to refer to *Plantago lanceolata* and other *Plantago* species). The main applications proposed for the patented products are in the treatment of dermatological and neurodegenerative diseases, as well as antioxidants. **Discussion/Conclusions:** The present review shows the major fields that patent products involving *Plantago* as well as the major countries and applicants that invest in new technologies and intellectual property in this area.

**Keywords:** Health Care, Patents, *Plantago*, Plantain herb, Products and Processes Survey.

















































9. ANEXO 2 – DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE AUCUBINA E  
VERBASCOSÍDEO ISOLADOS DE *Plantago australis* E *Plantago major*











10. ANEXO 3 – ESTATÍSTICAS ANOVA E TESTE DE TUKEY DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE *Plantago australis* E *Plantago major*









