UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SANDRA MARIA SCHENATTO PALAVICINI

Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidante e Antimicrobiana e Toxicidade de Extratos de Sementes de Tansagem (*Plantago major e Plantago tomentosa)*

Orientadores: Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
Profª. Drª. Clarice Steffens

ERECHIM, RS - BRASIL
MARÇO DE 2019

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidante e Antimicrobiana e Toxicidade de Extratos de Sementes de Tansagem (*Plantago major e Plantago tomentosa*)

Sandra Maria Schenatto Palavicini

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI- Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL
MARÇO DE 2019

Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidante e Antimicrobiana e Toxicidade de Extratos de Sementes de Tansagem (*Plantago major e Plantago tomentosa*)

Sandra Maria Schenatto Palavicini

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

_____

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
Orientador

_____

Profª. Drª Clarice Steffens
Orientador

_____

Profª. Drª. Geciane Toniazzo Backes
URI Erechim

_____

Profª. Drª Saionara Eliane Salomoni
UERGS Erechim

Erechim, março de 2019

P154p Palavicini, Sandra Maria Schenatto
Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana e toxidade de extratos de sementes de tansagem (*Plantago major* e *Plantago tomentosa*) / Sandra Maria Schenatto Palavacini. – 2019.
101 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

"Orientação: Rogério Luis Cansian; Clarice Steffens"

1. Planta alimentícia não convencional 2. Tansagem 3. Flavonóides 4. Fenóis totais I. Título

C.D.U.: 664

Catalogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Dedico este trabalho:

Ao meu marido, Aerson, e meus filhos, Renan e Rovian pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, que são meus exemplos e também as minhas bases fortes, pelo amor, carinho, compreensão nos momentos de ausência, e pelo constante apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido Aerson pelo carinho e companheirismo, apoio e incentivo sempre, pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus filhos Renan e Rovian pelo companheirismo, disposição e ajuda nos momentos mais tensos e também nos momentos de alegria compartilhados.

Aos meus mestres da graduação e do mestrado, por todo conhecimento adquirido com eles, o qual me possibilitou chegar a mais esta conquista.

Aos meus orientadores Rogério Luis Cansian e Clarice Steffens pela orientação, aprendizado, dedicação, pelo auxílio nos momentos de dúvidas, pela confiança depositada em mim, contribuindo muito na minha formação profissional.

Aos bolsistas principalmente a Morgana Demarco e a Júlia Lisboa Bernardi, que me ensinaram tudo a respeito das etapas do trabalho a ser desenvolvido, sempre dispostas a ajudar. E aos demais bolsistas e funcionários da URI Erechim que sempre foram atenciosos e prestativos.

A colega doutoranda em Engenharia de Alimentos Roberta Cristina de Souza pela ajuda incondicional nos momentos de dúvidas e incertezas. Certamente sem a sua colaboração teria sido muito mais difícil. Valeu pelo incentivo e aprendizado!

Aos colegas de trabalho Idemar Pedro Menegat e Mauro Deboni pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis e pela compreensão nos períodos de ausência.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma, perto ou distante contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Perfil Fitoquímico, Atividades Antioxidante e Antimicrobiana e Toxicidade de Extratos de Sementes de Tansagem (*Plantago major e Plantago tomentosa*)

Sandra Maria Schenatto Palavicini

Orientadores: Rogério Luis Cansian

Clarice Steffens

RESUMO

A tansagem é uma antiga planta medicinal que é conhecida há séculos em todo o mundo, mas ainda é considerada erva daninha por muitas pessoas. Muitas destas plantas daninhas, também denominadas de “invasoras”, “mato” ou “inço”, a exemplo da tansagem, são plantas alimentícias não convencionais (PANC) mesmo que em desuso na atualidade, pela maioria da população. Existem muitos tipos de tansagem, sendo a *Plantago major* a de maior valor medicinal e a *Plantago tomentosa* amplamente distribuída pelo território brasileiro e menos estudada. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar as sementes de tansagem (*P. major* e *P. tomentosa*) quanto à composição centesimal, avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana e da toxicidade de extratos obtidos por extração fracionada e sequencial com solventes de polaridade crescente (n-hexano, diclorometano e etanol). Na composição centesimal das sementes obteve-se 10,51 e 9,47% de teores de umidade, 16,78 e 17,44% de proteína bruta, 0,10 e 0,11% de lipídios, 58,87 e 59,08% de carboidratos totais, 2,98 e 3,86% de cinzas brutas e 10,78 e 10,04% de fibra bruta para *P. major e P. tomentosa*, respectivamente. Em relação aos extratos, quanto ao teor de fenóis totais, obteve-se uma maior concentração na *P. major (*377,98 mgEAG/g) em comparação com a *P. tomentosa* (64,29 mgEAG/g). Para o teor de flavonóides totais, obteve-se uma maior concentração na *P. major* (211,42 mgEQ/g) em relação a *P. tomentosa* (156,70 mgEQ/g). E para taninos totais obteve-se um teor de 4.590 mg/100g para a *P. major* e 1.088 mg/100g para a *P. tomentosa*. Já na atividade antioxidante, a extração com etanol da *P. major* apresentou o melhor IC_{50} de 0,019 mg/mL. Em *P. tomentosa*, o melhor valor de IC_{50} foi de 0,139 mg/mL no extrato diclorometânico. Verificou-se que os extratos das sementes de tansagem possuem boa concentração inibitória mínima (CIM) frente à *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis* para todos os extratos (n-hexano, diclorometano e etanol). Os extratos de diclorometano e etanol de ambas as sementes não apresentaram toxicidade frente à larva da *Artemia Salina.* Somente os extratos de n-hexano apresentaram toxicidade, com CL_{50} de 58,88 µg/mL para a *P. tomentosa* e CL_{50} de 621,75 µg/mL para a *P. major*. O uso de extração por maceração a frio

fracionada e sequencial com solventes de diferentes polaridades das sementes de tansagem são uma alternativa para otimizar o processo de extração e obter melhores atividades biológicas. *P. tomentosa* e, principalmente *P. major* se destacaram em relação ao teor de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, demonstrando assim, uma excelente oportunidade de utilizar sementes de uma planta, muitas vezes negligenciada, visto que os seus extratos, exceto para n-hexano, apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana, sem apresentar toxicidade frente a *A. salina*.

Palavras-chave: *P. major, P. tomentosa*, fenóis totais, flavonóides totais, taninos totais, planta alimentícia não convencional (PANC).

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

Phytochemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activities and Toxicity of Tansagem Seed Extracts (*Plantago major* and *Plantago tomentosa*)

Sandra Maria Schenatto Palavicini

Advisors: Rogério Luis Cansian
Clarice Steffens

ABSTRACT

Tansagem (broadleaf plantain) is an ancient medicinal plant that has been known for centuries around the world but is still considered a weed by many people. Many of these weeds, also called "plant invaders", like tansagem, are unconventional food plants (UFPs), even in disuse in the present day by the majority of the population. There are many types of tansagem, being the *Plantago major* with major medicinal value, and *P. tomentosa* widely distributed by the Brazilian territory and less studied. In this sense, the objective of this work was analyse and compare seeds of tansagem (*P. major* and *P. tomentosa*) to the centesimal composition, evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and the toxicity of extracts obained by fracioned and sequential extraction with solvents of crescent polarity (n-hexane, dichloromethane e ethanol). In the centesimal composition of the seeds, 10.51 and 9.47% of moisture contents, 16.78 and 17.44% of crude protein, 0.10 and 0.11% of lipids, 58.87 and 59, 08% of total carbohydrates, 2.98 and 3.86% of crude ash and 10.78 and 10.04% of crude fiber were obtained, for *P. major* and *P. tomentosa*, respectively. Regarding the extracts, total phenol content was higher in *P. major* (377.98 mgEAG/g) compared to *P. tomentosa* (64.29 mgEAG/g). For the total flavonoid content, a higher concentration in *P. major* (211.42 mgEQ/g) was obtained in relation to *P. tomentosa* (156.70 mgEQ/g). For total tannins, a content of 4.590 mg/100g was obtained for *P. major* and 1,088 mg/100g for *P. tomentosa*. In the antioxidant activity, the ethanol extraction of *P. major* showed the best IC50 of 0.019 mg/mL. In *P. tomentosa*, the lowest IC_{50} value was 0.139 mg/mL in the dichloromethane extract. It was found that the extracts of the seeds had a minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* for all extracts (n-hexane, dichloromethane and ethanol). The dichloromethane and ethanol extracts of both seeds showed no toxicity to *Artemia salina* larvae. Only extracts of n-hexane showed toxicity, with LC_{50} of 58.88 µg/mL for *P. tomentosa* and LC_{50} of 621.75 µg/mL for *P. major*. The use of fractionated and sequential cold maceration extraction with solvents of different polarities of the tansagem seeds is an alternative to optimize the extraction process and obtain better biological activities. *P. tomentosa,* and especially *P. major*, showed a remarkable opportunity to use seeds of a plant, often neglected, since their extracts, except for n-hexane, presented antioxidant and antimicrobial activities, without toxicity to *A. salina.*

Key words: *P. major, P. tomentosa*, total phenols, total flavonoids, total tanins, unconventional food plants (UFPs).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVO 4
2.1. Objetivo Geral 4
2.2. Objetivos Específicos 4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
3.1. Nomenclatura Popular 5
3.2. Descrição Macroscópica da Tansagem 5
3.3. Usos Populares 7
3.4. Obtenção de Extratos 10
3.4.1. Extração com Solvente Orgânico 10
3.4.2. Maceração 12
3.5. Composição Físico-Química da Tansagem 14
3.6. Fenóis Totais 15
3.7. Flavonóides Totais 20
3.8. Taninos Totais 23
3.9. Atividade Antioxidante 25
3.10. Atividade Antimicrobiana (CIM) 27
3.11. Toxicidade 31
4. MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1. Obtenção da Matéria Prima 34
4.2. Composição Centesimal 35
4.2.1. Teor de Umidade 35
4.2.2. Teor de Cinzas 36
4.2.3. Teor de Proteínas 36
4.2.4. Teor de Lipídeos 36
4.2.5. Teor de Fibra Bruta 36
4.2.6. Teor de Carboidratos Totais 36
4.2.7. Caracterização de Minerais 37
4.3. Obtenção dos Extratos 37
4.4. Rendimento 39
4.5. Determinação do Teor de Fenóis Totais 39

4.6. Determinação do Teor de Flavonóides Totais 40
4.7. Determinação de Taninos Totais 41
4.8. Determinação da Atividade Antioxidante - DPPH 41
4.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 42
4.10. Determinação da Toxicidade 43
4.11. Análise Estatística 44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1. Composição Centesimal das Sementes de Tansagem 45
5.1.1. Minerais 45
5.2. Rendimento da Extração 47
5.3. Teor de Fenóis Totais 49
5.4. Teor de Flavonóides Totais 51
5.5. Taninos Totais 53
5.6. Atividade Antioxidante 54
5.7. Atividade Microbiana (CIM) 57
5.8. Toxicidade 60
6. CONCLUSÃO 65
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS 67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68
APÊNDICE I 84
APÊNDICE II 85
APÊNDICE III 86
APÊNDICE IV 87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem das duas espécies de tansagem (a) *P. major* e (b) *P. tomentosa.*.....6

Figura 2. Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos de sementes de tansagem *P. tomentosa* e *P. major*. 33

Figura 3. Sementes de duas espécies de tansagem (a) *P. tomentosa* e (b) *P. major* 35

Figura 4. Imagem dos diferentes extratos (n-hexano, diclorometano e etanol) das sementes de tansagem. 38

Figura 5. Curva padrão de ácido gálico para determinação de fenóis totais. 84

Figura 6. Curva padrão de quercetina para determinação de flavonoides totais.....85

Figura 7. Curva padrão para determinação de taninos. 86

Figura 8. Curvas de atividade antioxidante para extratos de sementes (a) *P. tomentosa* e (b) *P. major*.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da composição centesimal das sementes de tansagem. 45
Tabela 2. Conteúdo de minerais (mg/g), em base seca, das sementes de tansagem *P. major* e *P. tomentosa*.. 46
Tabela 3. Rendimento da massa do extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*.....47
Tabela 4. Teor de fenóis totais extraídos em extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em (mgEAG/g).. 49
Tabela 5. Teor de flavonóides totais extraídos em extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos (mgEQ/g).….....51
Tabela 6. T Teor de taninos totais extraídos com n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*. 53
Tabela 7. Atividade antioxidante de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em IC_{50} (mg/mL).55
Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e P. *tomentosa*, expressos em CIM (mg/mL).. 58
Tabela 9. Toxicidade de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em percentual (%) de mortalidade.....61
Tabela 10. Toxicidade de extratos em n-hexano que apresentaram mortalidade superior a 50%, expressos em concentração de letalidade (CL_{50}).....62

1. INTRODUÇÃO

O homem através do seu conhecimento empírico e estudos observou que a presença de substâncias encontradas nas plantas quando usadas sob a forma de mistura complexa ou transformada podem beneficiar o organismo (SILVA, PELINSO & CAMPELO, 2010). Neste contexto, a utilização das plantas tem sido uma prática generalizada pela medicina popular tanto nas zonas urbanas como rurais, de forma alternativa ou complementar aos tratamentos da medicina convencional (DORIGENI et al., 2001). Também, o uso das plantas medicinais possibilita resgatar e preservar o conhecimento popular das comunidades (SILVA, PELINSO & CAMPELO, 2010).

O gênero *Plantago* (Plantaginaceae) é amplamente distribuído em todo o mundo, incluindo 275 espécies (SAMUELSEN, 2000). Muitas plantas também possuem potencial alimentício, embora sejam classificadas como “plantas invasoras” ou “rudeiras” (ROSSI et al., 2005), denominadas como “daninhas” ou “inços”, pois permeiam entre as plantas cultivadas (KINUPP, 2007). Como exemplo pode-se citar a tansagem que é uma PANC (Planta Alimentícia Não Convencional).

A tansagem é uma antiga planta medicinal, conhecida há séculos em todo o mundo, considerada como erva daninha (SAMUELSEN, 2000). As espécies *Plantago major* e *Plantago tomentosa* tem origem no Norte da Europa e Ásia Central, adaptando-se bem a regiões tropicais (VELASCO-LEZAMA et al., 2006). No Brasil, a tansagem é encontrada em diversos domínios fitogeográficos, especialmente em terrenos úmidos e em climas temperados: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, sendo encontrada desde o norte até o sul do país (BRASIL, 2014).

Existem muitos tipos de tansagem, sendo a *P. major* a de maior valor medicinal (SAMUELSEN, 2000), a qual é utilizada como agente anestésico, antiviral, antiinflamatório, adstringente, anti-helmíntico, analgésico, analéptico, anti-histamínico, anti-reumático, antitumoral, anti-úlcera, diurético, expectorante e hipotensivo na medicina popular (BRASIL, 2014). A planta faz parte da lista de drogas vegetais notificadas, inserida na Resolução RDC nº

10, de 10 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010).

Dentre os diversos compostos que são encontrados na espécie *P. major*, destacam-se aqueles que possuem atividades biológicas (SAMUELSEN, 2000). Na literatura são encontrados alguns trabalhos que descrevem essas atividades em extratos da planta *P. major* (aquosos fluidos, incluindo decoctos e infusos, extratos aquosos secos, extratos hidroalcoólicos secos, extratos hidroalcoólicos fluidos, extratos metanólicos fluidos e extratos metanólicos secos), como fenóis, flavonoides, esterois, taninos, carboidratos (ALARCON-AGUILAR et al., 2006; ATTA et al., 2004), saponinas, alcaloides (ALARCON-AGUILAR et al., 2006), e triterpenos (ATTA et al., 2004).

Desse modo, para obtenção dessas atividades biológicas das sementes de tansagem diferentes métodos de extração são empregados como, maceração estática e dinâmica, decocção, infusão, turbólise, percolação em aparelho tipo Soxhlet, refluxo e extração em banho de ultrassom (BRASIL, 2014). Dentre esses métodos a extração por maceração a frio visa preservar compostos termossensíveis, já que todo o processo é mantido em temperatura baixa e controlada.

A maceração pode ser realizada de duas formas, a sequencial e a fracionada. Na sequencial são extraídos compostos mais seletivos, de acordo com o solvente empregado que tenha afinidade com as propriedades químicas a serem extraídas (AZMIR et al., 2013). Além disso, podem ser usados mais de um solvente com diferentes graus de polaridade, onde os compostos não desejados podem ser extraídos em outro solvente, fazendo assim, uma seleção natural (PATEL et al., 2016). Já na extração fracionada, o objetivo é obter um melhor rendimento do extrato, pois ao se aplicar o fracionamento dos solventes, evita-se a saturação dos mesmos, reduzindo o tempo de extração e melhorando seu desempenho.

O método de extração com solventes orgânicos pode ser promissor, por apresentar maior solubilização de substratos/produtos, ter uma maior redução da inibição/toxicidade de substratos/produtos e maior deslocamento do equilíbrio químico. Também por apresentar uma melhor recuperação de substratos/produtos e concentrações elevadas de produtos no isolamento e

purificação. A solubilidade do composto a ser extraído depende das suas características hidrofílica ou lipofílica, bem como a polaridade do solvente que também tem impacto sobre a eficácia da extração. Dentre os solventes utilizados na extração pode-se destacar o n-hexano, acetato de etila e etanol que são capazes de extrair compostos fenólicos, flavonóicos e terpenos (PATEL et al., 2016).

Na literatura são encontrados alguns estudos de extração com a semente de *P. major* no Egito (KOBEASY et al. 2011), no Irã (SOURI et al, 2008), na China (YANLING, 2017) e na Noruega (SAMUELSEN, 2000). Porém, na literatura consultada não foram encontrados relatos científicos estudando a extração com a semente da *P. tomentosa,* sendo essa planta encontrada em todo o território brasileiro, principalmente na região Sul do Brasil (VELLOSSO et al., 2007). Neste sentido, considerando o alto potencial das espécies de Plantago como fonte de compostos biologicamente ativos e a falta de informação sobre *P. tomentosa,* este trabalho buscou quantificar e comparar a composição química e as atividades biológicas de extratos das sementes de *P. major* e *P. tomentosa,* obtidos por extração fracionada e sequencial empregando solventes de diferentes polaridades (n-hexano, diclorometano e etanol).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Analisar e comparar as sementes de tansagem (*Plantago major* e *Plantago tomentosa*) quanto à composição centesimal das sementes, e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana, e a toxicidade de extratos obtidos por extração fracionada e sequencial com solventes de diferentes graus de polaridade.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as sementes de tansagem da *P. major* e *P. tomentosa* quanto a umidade e composição centesimal (proteína, gordura, cinza, fibra e carboidrato);
- Realizar a extração fracionada e sequencial com solventes de diferentes polaridades (n-hexano, diclorometano e etanol) e avaliar o rendimento de extração de sementes das duas espécies de tansagem;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonóides totais e taninos totais dos extratos obtidos;
- Avaliar e comparar a atividade antioxidante dos extratos obtidos, pelo método de captura de radicais livres com DPPH;
- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
- Avaliar a toxicidade dos extratos obtidos, sobre náuplios de *Artemia salina*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Nomenclatura Popular

A espécie *Plantago major* é conhecida como tanchagem maior (OLIVEIRA et al.,2012), tranchagem (RODRIGUES et al., 2006), transagem (OLIVEIRA et al., 2010), tansagem (PEREIRA et al., 2012), plantagem, trançagem (DE ALBUQUERQUE et al., 2007), ou ainda, como tançagem (ALBERTASSE et al., 2010). No Peru e em outros países castelhanos, a espécie é conhecida tradicionalmente como "llantén" (ROIG, 1988; TORRI, 2013). Já na América do Norte e em outros países de língua inglesa, é denominada de "*broad-leaf plantain*", "*broad-leaved plantain*", "*cart-track-plant*", "*great plantain*", "*white-man's-foot*", ou ainda, somente de "*plantain*" (BRAKO et al., 1995; SPRING, 1989). Na China tem como nome popular: "*da che qian*" (WU et al., 2011).

O nome popular "*plantain*" é utilizado para designar tanto *P. major*, quanto espécies de Musa, como *Musa acuminata* Colla e *Musa paradisiaca* (MISSOURI, 2014 *apud* BRASIL, 2014). *P. tomentosa* é uma planta invasora, sendo a espécie mais comum no Brasil, encontrada vastamente nas regiões sul do país (VELLOSSO et al., 2007).

3.2. Descrição Macroscópica da Tansagem

A *P. major* é uma planta herbácea, perene, ereta, não possui caule, pode chegar até 40 cm de altura. Suas folhas crescem em forma de roseta basal, com pecíolo longo, lâmina membranácea com enervação paralela e suas extremidades são irregularmente dentadas. As flores são pequenas, marrom-esverdeadas, hermafroditas e estão dispostas em longas espículas não ramificadas de até 25 cm que crescem da base da roseta. A *P. major* é polinizada pelo vento e produz grande quantidade de sementes, até 20.000 por planta. Suas sementes são pequenas e ovais (0,4-0,8 x 0,8-1,5 mm) e possuem sabor levemente amargo (TUTIN et al., 1976). As folhas e sementes

são as partes da planta mais comumente utilizadas na medicina tradicional (VELASCO-LEZAMA et al., 2006).

A *P. tomentosa* é uma planta perene, herbácea, acaule, ereta, densamente pubescente, com inflorescências espiciformes eretas e marrons, de 20-40 cm de altura (LORENZI, 2008). As flores se transformam em frutos (sementes) que são facilmente colhidas raspando-se entre os dedos toda inflorescências. A multiplicação ocorre apenas por sementes. *Plantago australis* e *P. tomentosa* são nativas do sul do Brasil (VELLOSSO et al., 2007).

As sementes ficam espessas quando umedecidas por causa de polissacarideos presentes no revestimento da semente e podem ser fixados a animais e humanos e assim serem espalhados por grandes distâncias (SAMUELSEN, 2000). A Figura 1 demonstra uma imagem das duas espécies de tansagem *P. major* e *P. tomentosa,* a qual se diferencia principalmente no formato e altura das folhas.

Figura 1. Imagem das duas espécies de tansagem (a) *P. major* e (b) *P. tomentosa.*

(a) (b)

Fonte: O Autor

3.3. Usos Populares

P. major é utilizada tradicionalmente para múltiplas enfermidades, variando de acordo com a parte da planta utilizada. As folhas são empregadas na medicina tradicional para tratamento de: feridas (NEVES, et al., 2009; ALBERTASSE et al., 2010; CORNARA, et al., 2010; SAVIKIN, et al., 2013), furúnculos (CORNARA et al., 2010; CAMEJO-RODRIGUES et al., 2003), abscessos (POLAT et al., 2012; SEZIK et al., 2001), cortes (TUZLAC & AYMAZ, 2001; SAVIKIN et al., 2013), picadas de abelha (CORNARA et al., 2010), picadas de insetos (MIRALDI et al., 2001; VITALINI et al., 2009), injúrias oculares (NEVES et al., 2009; GÓMEZ-ESTRADA et al., 2011; POLAT et al., 2012), disfonia (MIRALDI et al., 2001), resfriados, dor de dente (MIRALDI et al., 2001; PIERONI, 2000; SUZUKI & MASHU, 2010), tabagismo (PEREIRA et al., 2012), gengivite, dor de ouvido (SAGANUWAN, 2010), para problemas de voz e rouquidão, problemas na garganta (OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012; PEREIRA et al., 2012; ALBERTASSE et al., 2010), acne (ÜNSAL et al., 2010) e hemorroidas (SEZIK et al., 2001).

O uso interno das folhas é indicado popularmente para limpeza sanguínea (CAVENDER, 2006), acidente vascular cerebral (DE ALBUQUERQUE et al., 2007), infecções (OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012; OLIVEIRA, 2010), dores renais (GÓMEZ-ESTRADA et al., 2011), diarreia (MIRALDI et al., 2001; PETKEVICIUTE et al., 2010), dores de estômago e digestivas (POLAT et al., 2012), hemorragias (NEVES et al., 2009; SAGUNUWAN, 2010; MIRALDI et al., 2001; SEZIK et al., 2001), verminoses (MIRALDI et al., 2001), úlceras e fístulas (NEVES et al., 2009; PETKEVICIUTE et al., 2010; POLAT et al., 2012), fluxo menstrual abundante, fogachos (OSOSKI et al,. 2002), icterícia (PURKAYASTHA et al., 2005), tuberculose, câncer, estomatite, esplenite, pneumonia, hemofilia, estrangúria, epilepsia, elefantíase, hidropisia, problemas cardíacos e trombose (SAGANUWAN, 2010).

As folhas ainda são usadas como antissépticas (PIERONI, 2000), depurativas (PEREIRA, 2012; REHECHO et al., 2011; PIERONI, 2000), hemostáticas, antibacterianas, supurativas (PIERONI et al., 2005), diuréticas

(NEVES et al., 2009, REHECHO et al., 2011), desinfetantes, anti-inflamatórias (REHECHO et al., 2011), antipiréticas (TUZLAC & AYMAZ, 2001; SEZIK et al., 2001), para recuperação pós-parto (TORRI, 2013), bem como no combate ou neutralização dos efeitos causados por animais peçonhentos ou venenosos, tais como escorpiões, aranhas ou lagartos venenosos (VÁSQUEZ et al., 2013). O uso das folhas em associação com outras plantas é descrito para o tratamento de tosse (PETKEVICIUTE et al., 2010), reumatismo (SANZ-BISET et al., 2009; MARC et al., 2008), cálculos renais, fraturas ósseas, lesões de pele e, também, para purificação renal e sanguínea (SANZ-BISET et al., 2009).

As sementes de *P. major* são indicadas no tratamento de disenteria, febre (BADSHAH & HUSSAIN, 2011; FLEURENTIN & PELT, 1983), hemorroidas (SEZIK et al., 2001); sendo descrita também sua utilização em associação a outras plantas como emoliente em casos de tosse e dor de garganta (MIRALDI et al., 2001), assim como para combate de miomas uterinos (OSOSKI et al., 2002). Os frutos têm aplicação como adstringentes, tônicos, estimulantes, antissépticos, antipiréticos, incluindo combate a desordens estomacais e disenteria (HAQ & AHMAD et al., 2011).

A propriedade adstringente conferida pelos taninos, encontrados nas folhas de *P. major*, forma revestimentos protetores, atenuando a sensibilidade e dificultando infecções, além de proporcionar uma ação hemostática. Já as sementes de *P. major* possuem ação laxativa, por absorver grande quantidade de água, estimulando o peristaltismo (SAMUELSEN, 2000).

Na etnofarmacologia, as partes aéreas de *P. major* são utilizadas em casos de tosse, bronquite (SANZ-BISET et al., 2009; SAVIKIN et al., 2013), febre, desconforto gastrintestinal (SANZ-BISET et al., 2009), embolia (TUZLAC & AYMAZ, 2001) e no combate ou neutralização dos efeitos causados por animais peçonhentos ou venenosos, tais como escorpiões, aranhas ou lagartos venenosos (VÁSQUEZ et al., 2013). Os caules têm aplicação como emolientes, antitussígenos e estimulante (YOUNOS et al., 1987). As raízes são utilizadas para tratamento de diabetes, infecção urinária (AHMAD & HOLDSWORTH, 2003), úlceras gástricas, feridas

(PETKEVICIUTE et al., 2010), cânceres (REHECHO et al., 2011) e em casos de menorragia (SEZIK et al., 2001).

Por fim, a planta inteira é aplicada para tratamento de distúrbios hepáticos e estomacais (ORDOÑEZ, 2007; MOLARES & LADIO, 2009), feridas e queimaduras (NAMSA et al., 2009), infecções na garganta (RODRIGUES & GUEDES, 2006; OLIVEIRA, 2010), menorragia, dismenorreia (OSOSKI et al., 2002), pressão alta, inflamação (RODRIGUES & GUEDES, 2006), inflamação uterina (SAHEBKAR & EMAMI, 2013), dor ao urinar (SPRING, 1989; SANTOS et al., 2008) e de bexiga (SANTOS et al., 2008), infecção pelos vírus das hepatites A, B e C (MOLLIK et al., 2012), como expectorante (ORDOÑEZ, 2007), antialérgica e colerética (DENDEN et al., 2010) e em úlceras da pele causadas por *Leishmania* (FRANCA et al., 1996).

Oliveira et al. (2007), realizaram uma revisão bibliográfica sobre plantas medicinais indicadas para, especificamente, afecções odontológicas, fazendo uso de livros, artigos e sítios eletrônicos científicos e populares. Foram encontradas 132 espécies citadas como úteis no tratamento dessas afecções, estando dentre as mais citadas, *P. major*. As partes da planta utilizadas para esse fim foram as folhas, sementes e raízes, na forma de infusão e tintura (BRASIL, 2014).

Muitas plantas também possuem potencial alimentício, embora sejam classificadas como “plantas invasoras” ou “rudeiras” (ROSSI et al., 2005), denominadas como “daninhas” ou “inços”, pois permeiam entre as plantas cultivadas, porém, são espécies com grande importância ecológica e econômica. Muitas espécies são plantas alimentícias mesmo que em desuso, na atualidade, pela maioria da população (KINUPP, 2007) a exemplo da tansagem que é uma PANC (Planta Alimentícia Não Convencional), onde suas folhas podem ser utilizadas na culinária na forma de saladas, refogados, omeletes, e suas sementes no preparo de pães, bolachas e biscoitos ou *in natura*, raspando a espiga para retirar as sementes e esfregando com as mãos para a retirada das cascas. *Plantago coronopus* é comestível e cozida como um vegetal na cozinha tradicional dos Balcãs, suas folhas são ingredientes de salada na França e na Itália, e é uma cultura potencialmente importante para a alimentação animal (GÁLVEZ et al., 2005).

3.4. Obtenção de Extratos

3.4.1. Extração com Solvente Orgânico

A extração é a principal operação para preparações botânicas (SHI et al., 2002). Para a obtenção de compostos com atividade biológica são obtidos extratos, para retirar de forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados (SIMÕES, 2004).

A eficiência da extração de qualquer método convencional depende principalmente da escolha de solventes (COWAN, 1999 *apud* AZMIR et al., 2013). A polaridade do composto alvo é o fator mais importante para a escolha do solvente. A afinidade molecular entre o solvente e o soluto, a transferência de massa, o uso de co-solvente, a segurança ambiental, a toxicidade humana e a viabilidade financeira também devem ser consideradas na seleção de solventes para a extração de compostos bioativos (AZMIR et al., 2013).

A separação de compostos de produtos naturais pode ser conseguida pela transferência destes de uma fase para outra (sólido-líquido, líquido-líquido) dentro de um processo industrial. A extração por solvente utiliza as diferenças em interações intermoleculares na fase líquida (WENNERSTEN, 1992). No processamento industrial, muitos produtos são separados de sua estrutura natural original por extração sólido-líquido, como por exemplo, na produção de óleos vegetais, utilizando solventes orgânicos, tais como hexano, acetona e éter. Na extração por solvente, duas fases estão em contato íntimo e o(s) soluto(s) pode(m) se difundir do sólido para a fase líquida, resultando na separação dos componentes contidos originalmente no sólido (GEANKOPLIS, 2003).

A extração por solvente é uma operação de transferência de massa amplamente utilizada na indústria de alimentos para retirar o óleo de sementes/e ou polpas oleaginosas. Após terem seu tamanho reduzido, estas sementes são colocadas em contato com o solvente, de maneira que ocorra a

transferência do óleo da fase sólida para a fase líquida (PERRY & CHILTON, 1986).

Nas extrações com solventes orgânicos podem ser utilizados álcoois (metílico, etílico e propílico), hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, água e éter de petróleo (MEZZOMO, 2008). O método de extração com solventes orgânicos apresenta solubilização de substratos/produtos, com redução da inibição/toxicidade de substratos/produtos e maior deslocamento do equilíbrio químico. Também apresenta uma boa recuperação de substratos/produtos e concentrações elevadas de produtos no isolamento e purificação.

Os teores de constituintes totais em derivados vegetais dependem do processo de extração e suas variáveis, como o solvente utilizado. A solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies em um sistema em relação a polaridade (MEZZOMO, 2008). Segundo Barwick (1997), a polaridade pode ser definida como a habilidade da molécula em participar de interações de todas as espécies com outras moléculas de polaridade similar. A polaridade do solvente interfere na extração, podendo extrair flavonóides glicosilados no extrato etanólico ou flavonóides livres no extrato em acetato de etila (CECHINEL FILHO, 1998). Substâncias fenólicas têm maior afinidade por solventes polares como etanol e acetato de etila (SPAGOLLA et al. 2009; TIWARI et al., 2011).

Dentre os solventes utilizados em extrações com diferentes polaridades, destacam-se: n-hexano (polaridade 0) por apresentar polaridade nula; acetato de etila (polaridade 4,4) por apresentar bons resultados na literatura na extração de compostos fenólicos; etanol (polaridade 5,2) por ser utilizado comumente nas indústrias de extração de óleos comestíveis; e o diclorometano (polaridade 3,1) por apresentar polaridade intermediária entre os solventes utilizados (NUCLEAR, CAQ IND. & COM. LTDA *apud* MEZZOMO, 2008).

3.4.2. Maceração

Diferentes métodos para a extração de tansagem são empregados, entre eles a maceração estática e dinâmica, decocção, infusão, turbólise, percolação em aparelho tipo Soxhlet, refluxo, banho de ultrassom e maceração (BRASIL, 2014). A maceração é o nome dado a uma operação física que consiste em retirar ou extrair de um corpo, certas substâncias que são consideradas princípios ativos. Esses princípios ativos podem ser posteriormente utilizados com certas finalidades, quer farmacológicas, quer químicas. A maceração é normalmente feita moendo previamente o corpo ou substância a macerar, seguindo-se a utilização de um solvente para extração dos princípios ativos. A maceração a frio, visa preservar compostos termossensíveis, já que todo o processo é mantido em temperatura baixa e controlada (SIMÕES et al., 2010).

A maceração pode ser sequencial e fracionada; na sequencial, se extrai compostos mais seletivos, pois a depender do composto que se deseja extrair, deve-se escolher o solvente que tenha maior afinidade com as suas propriedades químicas, fazendo assim o uso de solventes com diversos graus de polaridade (AZMIR et al., 2013). Outra vantagem da extração sequencial é que, como os compostos tem mais afinidade por determinado solvente, usando mais de um solvente com polaridade diferente, os compostos não desejados serão extraídos em outro solvente, fazendo assim, uma seleção natural (faxina), como é o caso do n-hexano, do acetato de etila e do etanol que são solventes capazes de extrair compostos fenólicos, flavonóicos e terpenos (PATEL et al., 2016). Já na extração fracionada obtém-se um melhor rendimento do extrato, pois ao se aplicar o fracionamento dos solventes, evita-se a saturação dos mesmos, reduzindo assim o tempo de extração, bem como melhorando seu desempenho.

As soluções extrativas utilizadas são os derivados de folhas, caules, flores, sementes e raízes da planta. Destes extratos, os mais estudados são aquosos fluidos (incluindo decoctos e infusos), aquosos secos, hidroalcoólicos secos, hidroalcoólicos fluidos, metanólicos fluidos e metanólicos secos. Além dos derivados de extratos acetônicos, hexânicos, clorofórmicos,

diclorometânicos, acetato de etila e acetonitrílicos secos, bem como extratos fluidos diclorometânicos, clorofórmicos e obtidos por fluido supercrítico (BRASIL, 2014).

Dentre os métodos tradicionais de extração com solvente orgânico destacam-se a extração soxhlet e a maceração. O processo de maceração consiste em deixar a matéria prima em contato com o solvente por determinado tempo, em recipiente fechado, à temperatura ambiente para extrair os compostos de interesse. Este processo, mesmo utilizando agitação, pode resultar em longos períodos de extração sem renovação do líquido extrator (MEZZOMO, 2008). A extração em Soxhlet possibilita uma extração altamente eficiente, com renovação de solvente a ciclo, empregando uma quantidade reduzida de solvente. Contudo em ambos, o principal problema é a necessidade de eliminação do solvente após a extração, normalmente realizado através da destilação, o que ocasiona a degradação térmica do soluto e de seus componentes, além da presença residual de solventes junto com os compostos extraídos (SIMÕES, 2004; ROSSO, 2009).

A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos. A extração sólido-líquido envolve a remoção de um componente desejado (o soluto) usando-se um líquido (solvente) que é capaz de dissolver o soluto. Isso compreende a mistura tanto em um único estágio quanto em múltiplos estágios, por um tempo predeterminado, para então, separar o solvente. Durante o período de extração ocorre a transferência de massa dos solutos para o solvente em três etapas: inicialmente o soluto dissolve-se no solvente; em seguida a solução penetra através da partícula do alimento para sua superfície e depois a solução torna-se dispersa no volume total do solvente (FELLOWS, 2006; PEREIRA & STRINGHETA, 1998).

O material a ser submetido à extração é previamente triturado e laminado a fim de facilitar a penetração do solvente, uma vez que pode estar contido no interior das células (sendo removido por difusão), também estará em forma de uma camada em volta das partículas do material, sendo removido por simples dissolução (MORETTO & FETT, 1998). Como resultado,

tem-se uma extração com velocidade elevada no início e em seguida, decrescente, não atingindo uma remoção completa, na prática (MORETTO & FETT, 1998). Desta forma, com o fracionamento do solvente, visa-se evitar a saturação do mesmo.

Durante a extração, o tempo de contato deve ser suficiente para que o solvente dissolva a quantidade suficiente de soluto e para que as mudanças na composição alcancem o equilíbrio. O tempo requerido depende da solubilidade de um dado soluto no solvente selecionado, além da temperatura de extração, área superficial e a viscosidade do solvente. A temperatura normalmente é limitada devido aos custos elevados e resistência térmica do soluto. Quanto menor for o tamanho da partícula, maior será superfície de contato, o que por sua vez melhora a extração. A viscosidade do solvente deve ser suficientemente baixa para facilitar a penetração do solvente nas partículas sólidas. E quanto maior o fluxo do solvente, menor será a camada limite de soluto concentrado na superfície das partículas, o que aumenta a extração (FELLOWS, 2006).

3.5. Composição Físico-Química da Tansagem

A composição físico-química da tansagem é determinada por fatores ambientais, condições climáticas, sol, entre outras. Em estudo realizado por Kobeasy et al. (2010) em relação a composição da *P. major* encontrada nas sementes, obtiveram um teor de 15,01% de proteína bruta, 1,45% de gordura, 7,14% de cinza, 26,9 % de fibra bruta e 45,87% de carboidrato, as quais podem ser utilizadas para a alimentação humana. Por outro lado, as folhas apresentaram 14,5% de proteínas, 0,9% de gorduras, 16,8% de cinzas, 13,7% de fibra bruta e 48,89 % de carboidratos. Desse modo as sementes apresentam maiores teores de fibras e proteínas quando comparando as folhas.

De acordo com Romero-Baranzini et al. (2006) as sementes de *Plantago ovata* contém 17,4% de proteína, 6,7% de gordura, 2,7% de cinza, 24,6% de fibra bruta e 48,6% de carboidrato. O teor de proteína difere entre

as cultivares devido a diferenças no genótipo e nas condições ambientais durante o desenvolvimento e amadurecimento dos grãos.

O teor de cinzas totais encontrado nas folhas de *P. major*, nos estudos correspondentes, variou de 11,5 a 13,7% (DE LIMA NETO, 1991; BRAZ et al., 2012). Os minerais extraídos da planta *P. major* em maiores quantidades são fósforo (0,28%), potássio (2,83%), cálcio (1,26%), magnésio (0,37%) e enxofre (0,22%), e em menor quantidade o boro (9 ppm), cobre (7 ppm), ferro (288 ppm), manganês (60 ppm) e zinco (33 ppm) (DE LIMA NETO, 1991). Nas folhas da planta foi encontrado alto conteúdo de vitamina C (45,1 mg/100 g peso seco) e carotenóides totais com valor de aproximadamente a 8,51 mg/100g, onde o β-caroteno é o principal pigmento (GUIL-GUERRERO, 2001).

As folhas desta planta halófita mostraram ainda conter minerais em níveis semelhantes aos da maioria dos vegetais, provando ser uma boa fonte de elementos como o cálcio, sódio, ferro e magnésio, bem como de vários dos aminoácidos essenciais, o que justifica seu uso na alimentação. Além disso, sabe-se que outras espécies de Plantago, nomeadamente *P. major*, *Plantago lanceolata* (*P. lanceolata*) e *Plantago media* (*P. media)* são fontes valiosas de aminoácidos e minerais, que podem contribuir para a sua utilização como ingrediente na nutrição humana (GUIL-GUERRERO, 2001; AMAGLO et al., 2010). Não há relatos na literatura especializada sobre a composição físico-química das sementes da *P. tomentosa*.

3.6. Fenóis Totais

Um grupo bastante comum de antioxidantes presentes em fontes vegetais são os compostos fenólicos. Os fenólicos são conhecidos como metabólicos secundários por não exercerem função direta no desenvolvimento do vegetal, mas exercerem funções de proteção contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra a radiação ultravioleta, além de atrativos na polinização ou dispersão de frutos (HAMMERSCHMIDT & PRATT, 1987).

Os compostos fenólicos permitem a doação do hidrogênio fenólico a um radical livre, regenerando-o e interrompendo o mecanismo de oxidação por radical livre. Os fenóis presentes em produtos naturais variam de moléculas simples, como o ácido fenólico a compostos polifenólicos grandes e altamente polimerizados, como os taninos (JURISIC et al., 2005). Desta maneira, os compostos fenólicos transformam-se em radicais livres e os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (RAMALHO & JORGE, 2006).

Os polifenóis têm capacidade de eliminação de radicais livres pela neutralização de oxidantes reativos perigosos, bem como quelantes de íons metálicos (BRANTNER et al., 1994). Os compostos fenólicos são gerados do metabolismo secundário das plantas e são essenciais para o seu crescimento e reprodução, no sentido de preservação da espécie contra o ataque de insetos, por exemplo. Além disso, são elaborados em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV-Visível, dentre outras (NACZK & SHAHIDI, 2004). Dentre os compostos fenólicos de fontes naturais, os que mais se sobressaem são os ácidos fenólicos e os flavonóides (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos, em geral, são caracterizados como polares, e são mais facilmente solubilizados em solventes de maior grau de polaridade, como o etanol (polaridade de 5,2) e acetato de etila (polaridade de 4,4). No entanto, ainda podem ser solubilizados em solventes apolares como o hexano ou o dióxido de carbono (ANDRADE, 2011). Também podem existir tanto nas formas solúveis em água como nas formas ligadas à parede celular nos tecidos vegetais. As formas solúveis em água (extraíveis por solventes polares, como água, metanol e acetona) consistem em ácidos fenólicos "livres" e ésteres (KRISTEN et al., 2011). Em sementes, acredita-se também que estes compostos sirvam como inibidores de germinação e, portanto, desempenhem um papel importante na regulação da persistência de sementes em bancos de sementes do solo (GALLAGHER & FUERST 2006 *apud* KRISTEN et al., 2011).

Uma técnica bastante utilizada na investigação de extratos com potencial antioxidante é a determinação do teor de fenólicos totais (TFT) através do método de Folin-Ciocalteu. De acordo com Roginsk & Lissi (2005), ainda que este método não caracterize ou expresse um valor de atividade antioxidante, é um dos melhores para a estimativa da capacidade antioxidante de alimentos. A técnica, que é bastante prática, consiste na mensuração dos compostos fenólicos presentes na amostra, sendo que valores altos para o TFT sugerem elevada atividade antioxidante. No método de Folin-Ciocalteu o mecanismo é uma reação de oxi-redução, sendo que o sistema de teste consiste numa mistura de tungstato e molibdato em meio básico. Neste meio os compostos fenólicos são oxidados, reação que resulta na formação do radical superóxido, o qual reage com o molibdato formando óxido de molibdênio, que possui coloração azul intensa (MEZZOMO, 2008; ROGINSK & LISSI, 2005). O aparecimento da coloração azul é mensurado através de leitura da absorbância, a qual será proporcional ao conteúdo de fenólicos presentes no meio reacional. O conteúdo de fenólicos totais é calculado a partir de uma curva padrão de ácido gálico. O resultado da análise, portanto, é expresso em EAG (equivalente em ácido gálico). Diversos pesquisadores têm utilizado os métodos do DPPH e de Folin-Ciocalteu na análise do potencial antioxidante de produtos naturais (BISCAIA, 2007; CAMPOS et al., 2008; CHAN et al., 2007 *apud* MEZZOMO, 2008).

Stef et al. (2010) avaliaram o teor de fenóis totais em trinta e três espécies diferentes de plantas, dentre elas a *P. major*, pelo método de Folin-Ciocalteu. O teor de fenóis totais foi de 423 µg de Trolox/g. Este valor ficou na média entre todas as plantas estudadas (conteúdos variaram de 1168 a 1184 µg de Trolox/g). Souri et al. (2008) relataram que o teor de fenóis encontrados nas sementes *P. major* foi de 6,73 mg/g e *Plantago ovata* de 2,49 mg/g, onde enquadraram em três grupos: alto (> 3,00 mg/g), moderado (1,00-3,00 mg/g) e baixo (<1,00 mg/g).

O conteúdo de polifenóis totais encontrados na parte aérea do vegetal *P. major*, seca à temperatura ambiente, foi de 4,6% (MAKHMUDOV et al., 2011). Já o teor de flavonoides obtido das folhas em pó foi de 0,09% (p/p), valores esses expressos em relação à quercetina (CORDEIRO, 2005).

Em estudo realizado por Makhmudov et al. (2011), onde foi feita cromatografia em papel, usando sistema n-butanol:ácido acético:água (40:12:28), possibilitou a identificação de onze compostos polifenólicos. O ácido gálico, rutina, luteolina, isoramnetina, hiperosídeo, quercetina, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil-β-D-glicose, 1,2,3-tri-*O*-galoil-β-D-glicose, 1,3,4,6-tetra-*O*-galoil-β-D-glicose, hexa-hidróxi-difenoil-1-(*O*-2-*O*-galoil-β-D-glicopiranosídeo)-1-(*O*-β-D-xilopiranosídeo) diéster e hexa-hidróxi-difenoil-1-(*O*-β-D-glicopiranosídeo)-2-(*O*-4-*O*-galoil-β-D-glicopiranosideo) diéster foram encontrados.

Barton et al. (2006) avaliaram a influência do cultivo solitário ou em vizinhança a outras plantas no crescimento e teor de iridoide glicosídeos em *P. major*. As folhas da planta, após os cultivos em estufa, foram analisadas por cromatografia gasosa. Observou-se o aumento no teor de aucubina (iridoide glicosídeo) (nas plantas cultivadas agrupadas), quando do cultivo com plantas vizinhas, possivelmente associado a uma competição e defesa da planta.

Muitos polifenóis foram encontrados nos derivados das folhas de *P. major* (CORDEIRO, 2005; IVANOVA et al., 2005; ZUBAIR et al., 2012), como exemplo: plantamajosídeo (ZUBAIR et al., 2011; ZUBAIR et al., 2012), verbascosídeo (ZUBAIR et al., 2011), acteosídeo (RANDIC et al., 2008), baicaleína (MAKSYUTINA, 1971), escutelareína e seus derivados glicosilados (MAKSYUTINA, 1971; NISHIBE et al., 1995), luteolina (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1998), apigenina (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1998; TOYODA et al., 1997), esculetina (TOYODA et al., 1997), canferol (TOYODA et al., 1997), ácidos hidroxicinâmicos, ácido clorogênico e neoclorogênico (MAKSYUTINA, 1971), bem como outros derivados glicosilados (ZUBAIR et al., 2012; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1998).

Em estudo realizado com diferentes temperaturas de secagem das amostras no conteúdo de polifenóis, observou-se que os conteúdos de P1 (composto não-identificado), plantamajosídeo e P3 (outro composto não-identificado) foram 58, 68 e 52%, respectivamente. Esses teores foram mais elevados nas amostras liofilizadas em comparação com as amostras secas a 50 °C. Verificou-se que a secagem do material vegetal sob temperaturas mais

elevadas provocou diminuição nos teores dos compostos avaliados. Porém, considerando os custos elevados do método de liofilização, os autores optaram pela secagem convencional do material vegetal sob temperaturas de até 30 °C (ZUBAIR et al., 2011).

Nos extratos das sementes muitos dos compostos já citados também foram descritos como fenólicos (ZUBAIR et al., 2011; SOURI et al., 2008), dentre eles o verbascosídeo (EGOROV et al., 2004) e os polissacarídeos (SAMUELSEN et al., 1999).

Em uma revisão realizada por Ahmad et al. (2003), os autores relatam os compostos que foram isolados da *P. major*: ácido ascórbico, ácido ferúlico, niacina, ácido gentísico, plantagonina, planteose, ácido salicílico, plantastina, ácido ursólico e ácido vanílico. Já na revisão de Rønsted et al. (2000), são relatados a aucubina e melitosídeo, além de asperulosídeo. Da planta coletada no Egito foram isolados melampirosídeo, plantarenalosídeo e ixorosídeo. Majorosídeo foi encontrado em coleções da Bulgária e Mongolia. 10-hidróximajorosídeo e 10-acetóximajorosídeo também foram encontrados. Isolou-se, adicionalmente, ácido geniposídico, gardosídeo, verbascosídeo e plantamajosídeo (KOBEASY et al., 2011).

Samuelsen (1999) apresenta uma extensa revisão sobre os compostos já isolados e identificados na planta. Nas sementes existem relatos da presença de carboidratos tanto mono, quanto polissacarídicos e de pectinas. Ácidos graxos também foram isolados das sementes, principalmente, os insaturados. Na planta ainda foram encontrados os alcaloides indicaína e plantagonina. Derivados do ácido cafeico foram observados no extrato metanólico, sendo o majoritário: plantamajosídeo; enquanto que derivados do ácido clorogênico verificados no extrato aquoso. Flavonoides, iridoide glicosídeos, vitaminas e outros terpenos, como ácidos ursólico e oleanólico, foram isolados, principalmente, das folhas da *P. major*. Não há relatos na literatura especializada sobre o teor fenóis totais nas sementes da *P. tomentosa*.

3.7. Flavonóides Totais

Os flavonóides constituem uma classe de compostos fenólicos de ampla distribuição no reino vegetal, com mais de 6.500 compostos diferentes descritos e cuja síntese não ocorre na espécie humana. (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). São importantes para o crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas. Atuam como atrativos visuais favorecendo a colonização, como um mecanismo de defesa contra o ataque de insetos e micro-organismos e como protetores da radiação ultravioleta (MUSCUIETTI & MARTINO, 2007).

Flavonóides é o nome dado a um grande grupo de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, vinculados à classe dos polifenóis. São encontrados em uma grande variedade de vegetais, sementes, cascas, raízes, flores, folhas, frutas e bebidas, como os chás e o vinho tinto (FELDMANN, 2001; WILLIANS, 2004). São consumidos regularmente na dieta humana e, apesar de não serem nutrientes, desempenham um importante papel na saúde humana. Atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrômbica, antiviral e anticarcinogênica dos flavonoides já foram encontradas em diversos estudos experimentais em animais e humanos (MIDDLETON et al., 2000).

As flavonas luteolina e 6-hidroxi luteolina são os principais flavonóides encontrados nas folhas e caules de *P. major,* os quais foram extraídos por maceração em etanol 70% e identificados por cromatografia e espectrofotometria UV (KAWASHTY et al., 1994; NISHIBE et al., 1995). Em testes realizados para a busca de metabólitos secundários em *P. major*, foram encontrados resultados positivos para alcaloides e flavonoides, no pó das folhas da planta (CORDEIRO, 2005; CORDEIRO et al., 2006).

Alguns flavonóides da *P. major* foram isolados, como a baicaleina, hispidulina, plantaginina (YUTING et al., 1990) e escutalareina (SANZ et al., 1999). Kawashty et al. (1994) isolou um grande número de flavonóides de *P. major* no Egito: 7-glucósido de luteolina, 7-glucuronido de hispidulina, 7-diglucósido de luteolina, 7-glucósido de apigenina, 7-glucósido de nepetina e 6-hidroxi 4-metoxi 7-galactosido de luteolina.

Em extratos das sementes de *P. major* diversos testes tiveram resultados positivos para flavonoides, esterois, taninos, carboidratos (ALARCON et al., 2006; ATTA et al., 2004), saponinas, alcaloides (ALARCON et al., 2006) e triterpenos (ATTA et al., 2004). Já para extratos das folhas, compostos fenólicos em geral (BRAZ et al., 2012), flavonoides (CORDEIRO, 2005; CORDEIRO et al., 2006; ATTA et al., 2004; DE PAULA, 2010), taninos (BRAZ et al., 2012; ATTA et al., 2004; ATTA et al., 2005), alcaloides (CORDEIRO, 2005; CORDEIRO et al., 2006; ATTA et al., 2005), esterois insaturados, triterpenos, carboidratos, lactonas/ésteres, proteínas/aminoácidos (ATTA et al., 2005), antraquinonas reduzidas, cumarinas e esteroides livres (DE PAULA, 2010) foram verificados.

A presença de flavonóides selecionados a partir de extratos de metanol de *P. major* foram confirmados usando a técnica Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas - LC/MS (BEARA et al., 2009). A planta inteira (100 g de planta seca) foi extraída em água quente (1000 mL) durante uma hora. Os flavonóides isolados do extrato aquoso foram aucubina, baicaleina, luteolina e baicalina, o glucurônido da baicaleína (CHIANG. et al., 1994).

Braz et al., (2012) realizaram, também, a análise cromatográfica em camada delgada (CCD) com a fase móvel de tolueno:acetato de etila:metanol:ácido fórmico (75:25:10:6) dos extratos das folhas de *P. major.* Foi possível verificar a presença dos ácidos cafeico e clorogênico.

A grande maioria dos estudos consultados relatam a avaliação de derivados das folhas da planta. Derivados obtidos de raízes, partes aéreas e da planta inteira também foram descritos. Para as folhas, iridoides glicosídeos, dentre eles: aucubina (LONG et al., 1995), assim como xiloglicanos (HOFFMAN et al., 2005), polissacarídeos, em especial a pectina PMII (GORIN, 1965; OLENNIKOV et al., 2005), ácidos triterpênicos (BAKER et al., 1998): oleanólico (ZACCHIGNA et al., 2009; TARVAINEM et al., 2010) e ursólico (ZACCHIGNA et al., 2009; OLENNIKOV et al., 2005) e ácidos orgânicos em menor quantidade: ácido tartárico, ácido cítrico e ácido succínico (OLENNIKOV et al., 2005), bem como alguns compostos não-aromáticos (JAMILAH et al., 2012) foram relatados.

Antibus et al. (1993) observaram nas raízes da planta a presença de sitosterol e ergosterol. Para as partes aéreas são descritos ácidos fenólicos e flavonoides, com destaque para a luteolina (MELLO et al., 2012) e iridoides glicosídeos, como aucubina e majorosídeo (HANDJIEVA et al., 1991; TASKOVA et al., 1999).

Na planta inteira é relatada a presença de compostos fenólicos (POURMORAD et al., 2006; POBLETE et al., 2009), identificando-se os ácidos cafeico e gálico (OZTURK et al., 2012), terpenos (SHARIFA et al., 2012), ácidos graxos e terpênicos, como: oleanólico (STENHOLM et al., 2013; ABUD et al., 2012), ursólico, linoleico, linolênico e palmítico (STENHOLM et al., 2013).

Degáspari et al. (2004) relatam que a distribuição dos fenólicos e flavonóides nos vegetais dependem de diversos outros fatores de acordo com a taxonomia do vegetal, bem como da variação das espécies. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioletas B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz.

O uso do nitrato de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é um procedimento sem nenhumas limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre eles quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais longe, quanto maior a proporção de flavonas. Isso é relacionado ao fato de que o comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nos vegetais. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 415 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (MARCUCCI et al.,1998 apud SILVA, 2011). Não há relatos na literatura especializada sobre o teor flavonoides totais nas sementes da *P. tomentosa*.

3.8. Taninos Totais

Evolutivamente as plantas tendem a sintetizar compostos, subprodutos do seu metabolismo primário, para diversas aplicações, como atrativos de polinizadores ou inibidores de fitófagos. Inclusos nesse metabolismo secundário, os taninos mostram-se extremamente promissores e podem ser estudados através de técnicas quantitativas relativamente fáceis e de baixo custo (MONTEIRO et al., 2005).

Os compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo, por exemplo, o papel de fagoinibidores contra herbívoros ou como agentes antimicrobianos (SANT'ANA et al., 2002). Como metabólitos secundários, os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO et al., 2001). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1991).

A propriedade adstringente conferida pelos taninos, encontrados nas folhas de *P. major*, forma revestimentos protetores, atenuando a sensibilidade e dificultando infecções, além de proporcionar uma ação hemostática. Já as sementes de *P. major* possuem ação laxativa, por absorver grande quantidade de água, estimulando o peristaltismo (SAMUELSEN, 2000).

Muitas espécies produtoras de taninos são usadas na medicina popular para diferentes finalidades e poucos estudos têm avaliado o potencial medicinal de tais substâncias (MONTEIRO et al., 2005). As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam

alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações (BRUNETON, 1991). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO et al., 2001).

Várias doenças degenerativas, como câncer, esclerose múltipla, arteroesclerose e o próprio processo de envelhecimento, estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres. Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO et al., 2001). Monteiro et al., (2005) sugerem que os taninos parecem ter duplo efeito, por um lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou atividades antimicrobianas, por outro lado, estão envolvidos possivelmente na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais.

Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (CASTRO et al., 1999).

Os taninos vegetais têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios, como precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Os métodos mais apropriados para determinação de taninos são os ensaios com precipitação de proteínas (HAGERMAN et al., 1997). Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, muito embora estes métodos sejam amplamente usados para analisar taninos de uma maneira geral, alguns autores afirmam que não há método ideal e reforçam que os métodos colorimétricos são os mais utilizados para a análise de taninos (MONDAL et al., 2001; MUELLER-HARVEY et al., 2001). Entre os métodos colorimétricos, o método de Folin-Ciocalteau é bem reconhecido e largamente usado (SCHOFIELD et al., 2001; FOLIN & CIOCALTEAU, 1927). Não há

relatos na literatura especializada sobre o teor de taninos totais nas sementes da *P. tomentosa*.

3.9. Atividade Antioxidante

Os polifenóis têm capacidade de eliminação de radicais livres pela naturalização de oxidantes reativos perigosos, bem como quelantes de íons metálicos (BRANTNER et al., 1994). Os antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a consequente destruição tissular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Os flavonoides com atividade antioxidante na *P. major* foram a baicaleína, hispidulina e a plantaginina (SAMUELSEN, 2000).

Os antioxidantes são substâncias que quando em baixa concentração, atrasa ou inibe a oxidação de um substrato, e tem capacidade de proteger o corpo contra os danos causados pelo estresse oxidativo induzido por radicais livres (SOURI et al., 2008). Nos sistemas biológicos o estresse oxidativo consiste, basicamente, no desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Tal processo ocorre quando a produção de espécies reativas ao oxigênio está acelerada ou quando os mecanismos de proteção contra as espécies reativas ao oxigênio estão deteriorados. A peroxidação lipídica consiste na principal consequência do estresse oxidativo, resultando em graves danos às membranas celulares. Acredita-se que cerca de 95% das doenças crônicas degenerativas (como é o caso do Alzheimer, aterosclerose e envelhecimento precoce, entre diversas outras) são induzidas por estresse oxidativo (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Algumas plantas medicinais são fontes promissoras de potenciais antioxidantes (SOURI et al., 2008). O chá feito de folhas verdes de *P. major* tem propriedades antioxidantes, sendo a capacidade antioxidante maior em folhas verdes frescas (CAMPOS & LISSI, 1995). Também, pela composição fitoquímica a Plantago tem sido estudada para avaliar sua capacidade de sequestrar radicais livres. Ela pode ser eficaz para fortalecer o sistema de defesa antioxidante, ou seja, uma planta com o poder de combater os radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Os métodos de investigação da atividade antioxidante de produtos naturais existentes são bastante diversificados e baseiam-se em diferentes mecanismos de reação. O método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um dos mais usados, por ser uma técnica fácil e rápida de medição, onde o radical orgânico livre, estável à temperatura ambiente, produz uma coloração violeta intensa quando em solução com etanol (RUFINO et al., 2007). Este radical é reduzido na presença de molécula antioxidante, resultando na descoloração da solução etanólica. O decréscimo na coloração, medido através da leitura de absorbância, é proporcional à concentração de antioxidantes no meio reacional (MENSOR et al., 2001).

Um estudo foi realizado por Kobeasy et al., (2010) para avaliar a atividade de recuperação de radicais livres de extratos de *P. major*, onde as folhas e as sementes foram extraídas em etanol pelo método de maceração (48 h) em água quente e água fria. O extrato aquoso obtido foi misturado, concentrado em vácuo e depois liofilizado. A atividade dos extratos utilizando radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) *in vitro* foi avaliada demostrando que o extrato etanólico da folha de *P. major* apresentou a maior atividade antioxidante, mesmo em baixa concentração de 20 ppm (78% de atividade) em relação a semente (25%), e aumentou com o aumento da concentração até 60 ppm (89,3% de atividade), que é também a concentração mais efetiva das sementes (85% de atividade) de *P. major*. Também foi observado que os extratos de etanol possuem mais atividade antioxidante quando comparada aos extratos de água fria e quente (KOBEASY, et al., 2010). Os resultados do referido estudo estão de acordo com Gálvez et al. (2005), Souri et al. (2008) e Beara et al. (2009) que examinaram as espécies de Plantago quanto à atividade antioxidante e relataram que ela poderia ser considerada como uma possível nova fonte de antioxidantes naturais.

Amić et al. (2003) avaliaram a atividade antioxidante de toda a planta de *P. major* extraída em metanol. Os resultados mostraram que o extrato a uma concentração de 0,8 mg/g apresentou 89,3% de atividade sequestradora. Os compostos responsáveis que têm a propriedade de eliminação contra DPPH são provavelmente os grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos de *P. major*. Outro componente químico que pode ser responsável

pela atividade sequestradora são os flavonóides. Eles possuem um anel β ocupado com 3′, 4′-di-hidroxi e/ou grupo 3-OH que pode atrair e diminuir os radicais de oxigênio em substâncias neutralizadas como água. Não há relatos na literatura especializada sobre a atividade antioxidante nas sementes da *P. tomentosa*.

3.10. Atividade Antimicrobiana (CIM)

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser avaliada através da determinação de uma pequena quantidade (mínima) da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003).

Os extratos éter de petróleo e etanólico das folhas de *P. major* foram avaliados pela técnica de microdiluição em caldo frente aos micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ATCC 12228, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 4352, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) ATCC 14153, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 1539, *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) e *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231. A amostra mais ativa foi o extrato etanólico, o qual apresentou CIM igual a 19,52 µg/mL frente a *S. aureus.* Frente aos outros micro-organismos, os valores de CIM foram: 625 µg/mL para *S. epidermidis* e *C. albicans*. O extrato éter de petróleo apresentou valores de CIM de 156,2 µg/mL frente a *S. aureus*; 312,5 µg/mL frente a *S. epidermidis*; 625 µg/mL frente a *S. flexneri* e *C. albicans*. Ambos extratos foram pouco ativos para a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e inativos para a *P. aeruginosa* (ÜNSAL et al., 2010).

Em outros estudos, encontra-se que o extrato éter de petróleo foi ativo frente à *E. coli,* apresentando halo de inibição de 8 a 9 mm, com valor de CIM igual a 312,5 µg/mL (UZUN et al., 2004). Para o extrato etanólico de *P. major*, os tamanhos dos halos de inibição (em mm) frente à: *E. coli, P. aeruginosa, S.*

aureus, C. albicans, Candida glabrata e *Candida krusei* foram de: 11, 10, 13, 7, 12 e 12, respectivamente. Demonstrando, portanto, maior atividade frente ao fungo *C. albicans* (SALTAN & ALTANLAR, 2003). Ainda, o extrato etanólico demonstrou leve atividade frente à *Pseudomonas vulgaris*, com halo de inibição igual a 7,33 mm (PEHLIVAN et al., 2012); e moderada inibição do crescimento de *E. coli* (42,5 mg/mL) e de *Bacillus cereus* (42,5 mg/mL) (METINER et al., 2012).

Vargas Neto (2004) avaliou o extrato etanólico de folhas e flores de *P. major* frente a diferentes cepas de *Candida*: *C. albicans, C. tropicallis, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. krusei* e *C. kerfyr*. O crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi completamente inibido pelo extrato de tansagem. O extrato foi fracamente ativo frente a *C. guilliermondii*, não sendo ativo frente às cepas de *C. parapsilosis, C. krusei* e *C. kerfyr*.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas da planta apresentaram efeito moderado frente a *C. krusei* (125 µg/mL), fraca inibição do crescimento de *S. aureus* e *C. tropicalis* (1000 µg/mL), não sendo ativos contra *C. parapsilosis, Bcillus subtilis* (*B. subtilis*)*, E. coli, P. aeruginosa* (HOLETZ et al., 2002), *C. albicans* (HOLETZ et al., 2002; HUAMANÍ et al., 2005) e *Aspergillus niger* (>1000 µg/mL) (HUAMANI & QUEIROZ, 2005).

Velasco-Lezama et al. (2006) analisaram a capacidade antimicrobiana dos extratos aquoso, metanólico, clorofórmico e hexânico das partes aéreas de *P. major*, frente à *E. coli, B. subtilis* e *C. albicans*. O crescimento de *B. subtilis* foi inibido pelo extrato aquoso de 78 a 21%, nas concentrações de 0,4 a 0,025 g/mL. O extrato hexânico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli*, o qual variou de 94 a 37%, nas mesmas concentrações. O extrato metanólico inibiu fracamente o crescimento de *B. subtilis* e o extrato clorofórmico inibiu fracamente o crescimento de *E. coli*.

O extrato das folhas da planta, obtido por compressão em filtro, demonstrou potente atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* tipo A e *S. pyogenes,* apresentando espessuras dos halos de inibição iguais à: 6,0; 4,5 e 4,4 cm, respectivamente (DE LIMA NETO, 1991). Freitas et al. (2002) avaliaram o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. major* frente a doze isolados de *S. aureus* a partir de secreções

da pele, vagina e orofaringe de pacientes. Todas as cepas mostraram-se sensíveis ao extrato hidroalcoólico (10 a 16 mm de halo de inibição), sendo que para três delas, os valores dos halos de inibição do extrato foram maiores que os do cloridrato de ciprofloxacina (controle positivo), demonstrando forte atividade bactericida.

De Paula (2010) avaliou o extrato metanólico de *P. major* frente a um painel de nove bactérias (6 Gram-negativas e 3 Gram-positivas) e 5 fungos, todos ATCC. O extrato de *P. major* mostrou-se ativo frente a *Enterocuccus faecalis* e *Enterobacter aerogenes* formando zona de inibição de 10 a 16 mm, nas concentrações entre 0,615 e 20 µg/disco, ainda, foi ativo frente ao fungo *C. parapsilosis,* formando zona de inibição de 15 mm, nas concentrações de 0,077 e 0,039 µg/disco. Na determinação da CIM, o extrato apresentou atividade moderada para *E. faecalis, S. aureus, S. pyogenes* (CIM = 500 µg/mL) e baixa atividade para *E. aerogenes, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, P. mirabilis* e *S. flexineri* (CIM = 1000 µg/mL).

O extrato acetônico de *P. major* demonstrou eficácia, em diferentes concentrações, na inibição do crescimento de *B. cereus* (3,56 mg/mL) e *Salmonella enteritidis* (7,13 mg/mL), seguida de *S. aureus, E. coli* e *K. pneumonia* (14,25 mg/mL), enquanto que menor eficácia foi observada frente a *B. subtilis, P. mirabilis, P. aeruginosa* e *S. epidermidis* (28,50 mg/mL) (METINER et al., 2012).

Os extratos aquosos e metanólico (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2009), bem como o extrato etanólico das partes aéreas de *P. major* (COGO et al., 2010), foram avaliados frente a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Todos extratos apresentaram-se como fracos agentes anti-*H. pylori*, sendo encontrados os seguintes valores de CIM: 250 µg/mL, para o extrato metanólico e 1000 µg/mL para o extrato aquoso (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2009). Para o extrato etanólico não foi possível calcular a concentração inibitória mínima (COGO et al., 2010). O extrato aquoso da planta também demonstrou ser levemente ativo frente à bactéria Gram negativa: *P. vulgaris*, apresentando 10,7 mm de halo de inibição do crescimento (PEHLIVAN et al., 2012).

A atividade antifúngica do extrato metanólico de *P. major* foi avaliada frente à nove cepas de fungos: *A. flavus, A. fumigatus, C. albicans, F.*

tricuictum, M. cookerii, M. gypseum, S. cerevisiae, T. viridae e *T. mentagrophytes*. O extrato avaliado foi capaz de inibir o crescimento de quatro fungos, com diâmetro médio de inibição entre 8 e 10 mm, sendo eles: *C. albicans, F. tricuictum, M. gypseum* e *S. cerevisiae* (MCCUTCHEON et al., 1994).

Isolados não-clínicos de Listeria (*L. ivanovii, L. monocytogenes, L. innocua,* e *L. murrayi*) foram utilizados para avaliação da atividade do extrato etanólico das partes aéreas de *P. major* obtido por Altanlar et al. (2006). As CIM do extrato de *P. major* foram: 50; 100; 12,5 e 50 µg/mL frente à *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua* e *L. murrayi*, respectivamente, sendo, assim, mais ativo frente à *L. innocua.*

Quanto à atividade de compostos isolados, Nikonorova et al. (2009) avaliaram a influência do verbascosídeo, isolado das sementes de *P. major,* frente a diferentes fungos patogênicos obtidos do solo: *F. culmorum, B. sorokiniana, B. cinerea, R. solani* e *A. solani*. O composto foi capaz de inibir o crescimento de *F. culmorum, B. sorokiniana* e *B. cinerea*. Em baixas concentrações, o composto influenciou no desenvolvimento morfológico dos fungos patogênicos.

A determinação da atividade antimicrobiana de associações do extrato de *P. major* a outros extratos vegetais, bem como de formulações contendo derivados de *P. major,* foi encontrada na literatura consultada. Rodriguez Pargas et al. (1996) relataram a inibição do crescimento de *C. albicans* e *T. rubrum* por um creme, contendo extrato hidroalcoólico das folhas de *P. major*. Os halos de inibição encontrados variaram de 24 a 27 mm, frente a *C. albicans* e de 10 a 17 mm, frente a *T. rubrum*, sendo esses valores similares aos observados para os cremes de nistatina e cetoconazol (2%), comercialmente utilizados no tratamento antifúngico.

Uma mistura de extratos hidroalcoólicos vegetais (dentre eles o de *P. major*), bem como o enxaguatório bucal (CORDEIRO, 2005; CORDEIRO et al., 2006) e, ainda, o gel dentifrício, contendo esses extratos vegetais, foram avaliados quanto às suas atividades antibacterianas (CORDEIRO, 2012). Nestes estudos, foi possível verificar que houve inibição do crescimento de todos os micro-organismos avaliados (*P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, B.*

subtilis e *E. faecalis*) pela mistura de extratos. As cepas de *S. aureus* e *B. subitlis* apresentaram maior sensibilidade frente à mistura de extratos e às formulações. Os valores das CIM variaram de 9,44 mg/mL a 37,75 mg/mL para a mistura de extratos vegetais e de 625 µL/mL a 2500 µL/mL para o enxaguatório contendo ou não os extratos vegetais. Para o gel dentifrício contendo ou não os extratos, o valor foi de 25 mg/mL. Assim, os extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais apresentaram atividade, principalmente sobre bactérias Gram-positivas. Não há relatos na literatura especializada sobre a atividade antimicrobiana nas sementes da *P. tomentosa*.

3.11. Toxicidade

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas (TÔRRES et al., 2005). Há uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz, sendo essas, muitas vezes, utilizadas no tratamento de doenças crônicas associadas com medicamentos convencionais (TOVAR & PETZEL, 2009).

O consumo excessivo de plantas medicinais pode levar ao acúmulo excessivo de ervas no organismo, o que pode causar toxicidade. Estudos recentes indicam que um grande número de pessoas usa ervas medicinais para suas necessidades de saúde. Portanto, as plantas medicinais desempenham um papel significativo no sistema de saúde de uma grande porcentagem da população mundial. Mais de 80% das pessoas do mundo dependem do sistema tradicional de ervas para os seus principais cuidados de saúde (AWENG et al., 2012). No entanto, a utilização de plantas na terapêutica e na alimentação deve ser restrita a plantas conhecidas e/ou corretamente identificadas (COLOMBO et al., 2010), pois podem ocorrer intoxicações com o uso de espécies vegetais, provocando graves acidentes.

Embora as plantas tenham efeitos valiosos, elas podem ser tóxicas para os seres humanos. Por isso, inúmeras pesquisas recentemente focaram na farmacologia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas por humanos. Elas indicam que, embora, numerosas plantas sejam usadas como fontes de

alimento e medicamento, algumas delas podem ter potencial mutagênico ou genotóxico (LAGARTO et al., 2001). Espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em homens e animais e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo o óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS & SUCHARA, 2013).

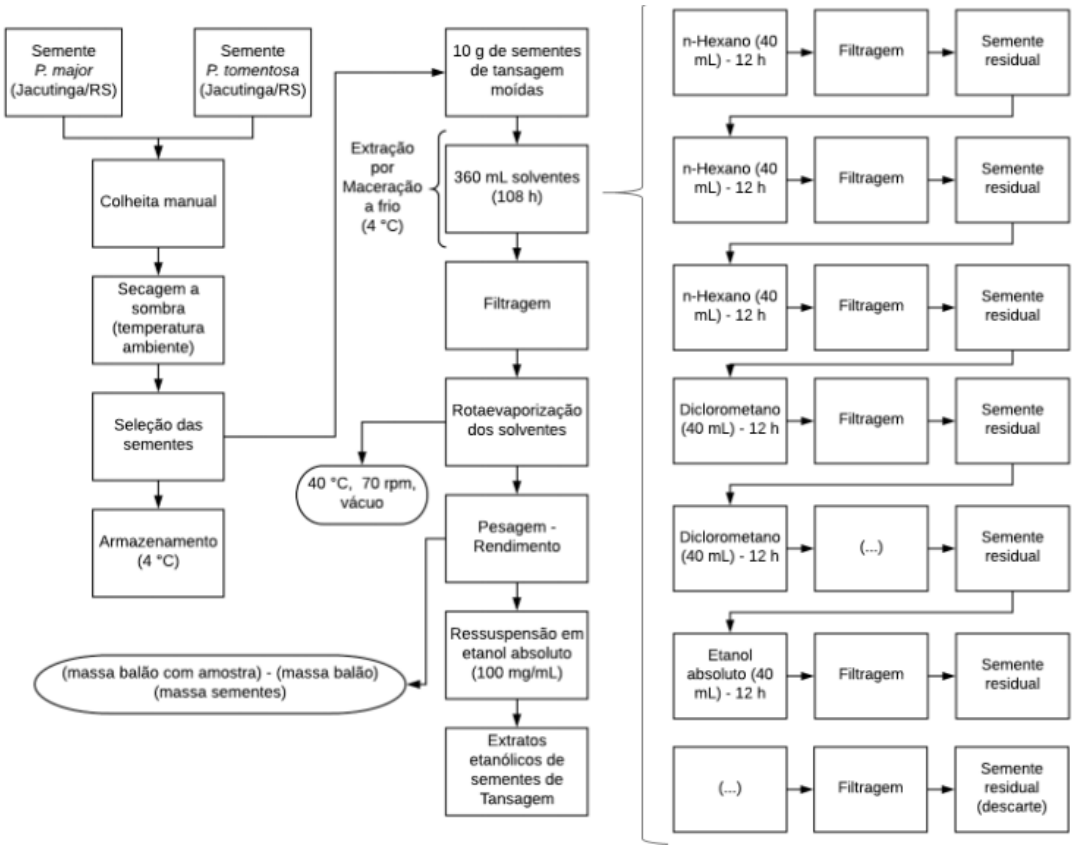
A tintura das folhas (extratos) de *P. major*, contendo 49% de teor alcoólico, foi avaliada em estudo *in vitro*, frente à *Artemia salina*, como teste alternativo para determinação da toxicidade de produtos naturais. As larvas vivas foram contadas e a concentração letal (CL_{50}) foi estimada. As concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL da tintura causaram mortalidades de 5,7; 9,3 e 10, respectivamente, sendo o valor de 10 correspondente a 100% mortalidade. O valor encontrado de CL_{50} para a tintura foi de 4,74 µg/mL. A mesma tintura foi avaliada por metodologia *in vivo*, administrando-a em camundongos albinos, em dose única, administrada por via oral. A CL_{50}, após 24 horas do início do tratamento, foi de 182,54 mg/kg. Foi estabelecida boa correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (r = 0,85) (LAGARTO PARRA et al., 2001).

Mirzaei et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade e a letalidade dos extratos n-hexano, acetato de etila e metanol de *P. major* a 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Foram utilizados camarões de água salgada (*Artemia salina*) para os testes. Água salgada artificial e timol foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Todos os extratos apresentaram mortalidade (100%) a 1000 µg/mL. O extrato acetato de etila foi o mais potente e apresentou a maior porcentagem de mortalidade com os menores valores de CL_{50} de 262 µg/mL. Após acetato de etila, o extrato hexânico apresentou a maior toxicidade com valor de CL_{50} de 290 µg/mL. O extrato metanólico apresentou a menor mortalidade com os maiores valores de CL_{50} de 321,6 µg/mL. Segundo os autores, estes extratos podem ser considerados tóxicos para células tumorais e normais. Não há relatos na literatura especializada sobre a toxicidade nas sementes da *P. tomentosa*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados os materiais e métodos utilizados nos experimentos de extração (tansagem) através da técnica de maceração a frio, além das análises de composição centesimal, rendimento, teor de fenóis totais, flavonoides totais e taninos totais, atividade antioxidante, concentração inibitória mínima (CIM), toxicidade dos extratos obtidos da semente da tansagem. Com exceção da composição centesimal que foi realizada no Laboratório Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo- RS, os experimentos citados foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. A Figura 2 demontra o Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos por maceração a frio, sequencial e fracionada das sementes de tansagem *P. tomentosa* e *P. major.*

Figura 2. Fluxograma da obtenção dos extratos etanólicos de sementes de tansagem *P. tomentosa* e *P. major*.



4.1. Obtenção da Matéria Prima

As duas espécies de tansagem, a *Plantago major* L. e *Plantago tomentosa* Lam. foram depositados para identificação no Herbário Padre Balduino Rambo (HPBR), na URI – Erechim, sob o número de registro de exsicata 12.282 e 12,285 respectivamente.

Os materiais utilizados neste trabalho foram as sementes de duas espécies de tansagem *P. major* e *P. tomentosa* obtidas no município de Jacutinga, nos meses de outubro e novembro de 2017, com coordenadas geográficas 27°43’51.03”S e 52°32’00.09”O, 27°43’53.78”S e 52°32’00.70”O, respectivamente, Rio Grande do Sul, Brasil.

As sementes foram colhidas manualmente de várias plantas no período de outubro a novembro de 2017 e armazenadas no mesmo recepiente onde cada espécie de tansagem foi omogenizada, seca em temperatura ambiente 25 °C e a sombra. Depois de secas, as sementes foram limpas para retiradas de cascas e sujidades e selecionadas, onde foram peneiradas em peneira de análise granulométrica (Bronzinox) mesh 35, e posteriormente armazenadas sob refrigeração (refrigerados doméstico 220. Brastemp, São Paulo/SP) a 4 °C por até 10 meses. A Figura 3 demontra uma imagem das sementes das duas espécies de tansagem, *P. tomentosa* e *P. major,* a qual se diferencia principalmente no tamanho e coloração das sementes.

Figura 3. Sementes de duas espécies de tansagem (a) *P. tomentosa* e (b) *P. major*

(a) (b)

Fonte: O Autor

4.2. Composição Centesimal

A composição centesimal das sementes das duas espécies de tansagem foi avaliada em relação a proteína bruta, lipídeos, cinzas, umidade, fibra bruta e carboidrato. As análises foram realizadas como descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) pelo Laboratório Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo- RS. Os carboidratos foram determinados pela diferença entre os constituintes (IAL, 2008).

4.2.1. Teor de Umidade

As análises de umidade e substâncias voláteis para *P. major* e *P. tomentosa* foram determinadas na perda de umidade e substâncias voláteis a

105 °C em estufa (Fanem®, modelo 320-SE) a 102 °C por aproximadamente 4 h, usando 3 g de amostra até peso constante (IAL, 2008).

4.2.2. Teor de Cinzas

As cinzas foram determinadas por meio da calcinação das amostras em mufla (Lavoisier®, modelo 400C), a 550 °C, por 6 h, pelo método gravimétrico, com carbonização prévia de 5 g de semente, a 300 ºC (IAL, 2008).

4.2.3. Teor de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada segundo método de Kjeldahl. Para a quantificação de nitrogênio total, foram pesadas 4 g de amostra. O conteúdo de proteína foi calculado multiplicando-se o resultado obtido pelo fator de 6,38 (IAL, 2008).

4.2.4. Teor de Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada por extração com solvente em Soxhlet conforme método descrito pelo Núcleo de Informação e Tecnologia – Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.2.5. Teor de Fibra Bruta

A determinação de fibra bruta foi realizada conforme método descrito pelo Núcleo de Informação e Tecnologia – Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.2.6. Teor de Carboidratos Totais

Foi determinado por diferença dos demais constituintes da composição físico-química, conforme a RDC nº 360 (BRASIL, 2003), o qual fundamenta-se

na soma dos teores de umidade, cinzas, proteína, fibra bruta e lipídeos, desse total foi feita a subtração do valor 100 (cem), obtendo-se então o teor de carboidratos.

4.2.7. Caracterização de Minerais

Os teores dos metais (Ca, Mg, Na, K, Zn, Cu, Cr, Fe, Mn) das sementes de tansagem foram determinados em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão por meio de espectrofotometria de absorção atômica por chama utilizando o espectrômetro de AAS (Varian® modelo *espectrAA 55*), com lâmpadas de cátodo oco. Os resultados foram expressos em mg/g base seca, segundo metodologia descrita por AOAC (1995)/ método 018/IV do Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

4.3. Obtenção dos Extratos

As sementes foram selecionadas e preparadas para extração pela remoção das cascas e sujidades, seguida pela moagem em moinho de facas (Micro moinho tipo Willye; modelo MA048, Piracicaba-SP, Brasil).

A extração das sementes de tansagem foi realizada por maceração (método a frio), conforme metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira IV Ed. (1998 e 2002), com algumas modificações. Os solventes n-hexano 95,0% (Cinética), diclorometano 99,5% (Química Moderna) e etanol 99,8% (Êxodo Científica) foram utilizados sequencialmente em um mesmo material vegetal, na proporção de 10 g de sementes moídas em 120 mL de cada solvente, sendo cada solvente adicionado em frações de 3 partes de 40 mL, visando minimizar a saturação do mesmo.

Os solventes utilizados foram escolhidos em função da sua polaridade, com a finalidade de investigar a extração de diferentes compostos na mesma amostra: n-hexano (polaridade 0); diclorometano (polaridade 3,1), por apresentar polaridade intermediária dentre os solventes selecionados; e etanol (polaridade 5,2), por ser utilizado comumente nas indústrias de

extração de óleos comestíveis (NUCLEAR, CAQ IND. & COM. LTDA *apud* MEZZOMO, 2008). As extrações seguiram o acréscimo de polaridade dos solventes, iniciando-se com o n-hexano, seguido do diclorometano e etanol.

Seguindo a ordem de polaridade crescente, iniciou-se a extração com o n-hexano, o qual foi fracionado em 3 partes iguais, conforme mencionado anteriormente, sendo a fração de solvente trocada a cada 12 h. Entre essas trocas foram realizadas filtragens da amostra em papel filtro (Whatman nº 1) e o filtrado (extrato) transferido para um balão volumétrico de fundo redondo, previamente pesado, sendo utilizado um único balão para o mesmo solvente. A mesma amostra de sementes moídas era novamente colocada em contato com uma nova fração de n-hexano para maceração, totalizando 36 h.

As sementes resultantes dessa etapa da extração foram utilizadas nas próximas extrações com os solventes diclorometano e etanol. Cada processo de extração foi realizado da mesma forma que o utilizado para o solvente n-hexano, ou seja, 3 frações iguais de cada solvente, trocados a cada 12 h, com filtragem entre as trocas, totalizando 108 h de maceração ou extração e 3 extratos diferentes (n-hexano, diclorometano e etanol).

Toda a extração foi realizada a temperatura controlada de 4 °C (±2 °C) em refrigerador doméstico (Brastemp, São Paulo, Brasil) estático e ao abrigo da luz. A Figura 4 demonstra os diferentes extratos (n-hexano, diclorometano e etanol) obtidos por maceração a frio e sequencial das sementes de tansagem.

Figura 4. Imagem dos diferentes extratos (n-hexano, diclorometano e etanol) das sementes de tansagem.

4.4. Rendimento

Os extratos obtidos através da maceração foram evaporados em rota-evaporador (modelo 802, Fisatom, São Paulo, Brasil) sob vácuo de -650 mmHg e rotação de 70 rpm e a 40 °C. O rendimento das extrações da *P. major* e *P. tomentosa* nos diferentes solventes (n-hexano, diclorometano e etanol) foi avaliado, em triplicata, por gravimetria pela diferença de peso entre o balão de fundo redondo com o extrato obtido após rotaevaporação e o balão inicialmente vazio, após ser mantido a 105 °C em estufa (Fanem®, modelo 320-SE), até peso constante e pesado em balança analítica (AS200, OHAUS, Florham Park/NJ).

Os extratos resultantes foram ressuspendidos em etanol 99,8% na concentração de 100 mg/mL (extrato padrão) para posterior avaliação dos teores de fenóis totais, flavonoides totais, taninos totais, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e toxicidade.

Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em refrigerador doméstico (refrigerador 220, Brastemp, São Paulo, Brasil) a 4 ºC para posterior análises dos mesmos.

4.5. Determinação do Teor de Fenóis Totais

Na determinação do teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi utilizada a metodologia de Singleton e Rossi (1965), com modificações, pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau (Dinâmica), utilizando o ácido gálico (Nuclear) como padrão de referência. As amostras analisadas para os extratos de n-hexano, diclorometano e etanol foram diluídas em etanol de forma a obter-se uma solução com concentração de 100 mg/mL. O meio reacional foi preparado em balões volumétricos de 10 mL, de acordo com a seguinte ordem pré-estabelecida de adição dos reagentes: 0,5 mL da amostra foram misturadas com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, diluído 1:10 com 2,0 mL de carbonato de sódio 4% (m/v) (Synth). Após agitação a mistura foi mantida em repouso por 2 h, ao abrigo de luz a 25 ºC. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Logen Scientific UV/VIS -

LS7052) a 740 nm e, por meio da correlação com a curva padrão de ácido gálico (Nuclear). O TFT foi expresso em termos de mg equivalente de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações entre 1 e 100 µg/mL (SINGLETON, 1999), conforme Apêndice I.

O branco foi preparado seguindo mesmo procedimento, substituindo-se apenas a adição da solução de amostra pela adição de etanol. Para construção da curva padrão de ácido gálico foi preparada uma solução estoque de ácido gálico em água destilada na concentração de 5 g/L. A partir desta solução estoque, novas diluições em água destilada foram feitas em balões volumétricos de 100 mL de modo a obter-se soluções com concentrações finais de 1 a 100 µg/mL. Uma alíquota de 100 µL de cada uma das soluções diluídas de ácido gálico foi utilizada para compor o meio reacional, em balão volumétrico de 10 mL, conforme procedimento descrito anteriormente para a solução de amostra.

Os resultados foram realizados em triplicata e expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de extrato seco (mg EAG/100g).

4.6. Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método descrito por Garrido, Ortiz e Pozo (2013), com adaptações, onde utilizou-se a quercetina (Merk) como padrão de referência. Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de amostra dos extratos na concentração de 5 mg/mL, 4,3 mL de etanol 70% (v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% (m/v) (Vetec) e 0,1 mL de acetato de potássio 10% (m/v) (Vetec). Os tubos foram agitados e armazenados em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 40 minutos. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Logen Scientific UV/VIS -LS7052) a 415 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, onde o teor de flavonoides foi obtido por análise de regressão linear a partir de uma curva padrão utilizando a quercetina em concentrações de 5 a 200 µg/mL, conforme

Apêndice II. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato da planta (mg EQ/g).

4.7. Determinação de Taninos Totais

O teor de taninos de extratos das duas espécies de sementes de tansagem obtidos com os solventes de diferentes polaridades foi determinado pelo método espectrofotométrico, utilizando espectrofotômetro UV-Visível (Pró-análise 1600, Brasil) a 760 nm. Foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteau e as análises foram realizadas como descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), em triplicata. A concentração foi calculada através de uma curva padrão, preparada com uma solução padrão de ácido tânico (Sigma Aldrich) na faixa de concentração de 0,1 a 0,9 mg/100 mL, conforme Apêndice III.

4.8. Determinação da Atividade Antioxidante - DPPH

A metodologia de avaliação da atividade antioxidante está fundamentada na medida da absorção do radical 2-2 difenil 1 picrilhidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich) em 515 nm (VIGNOLI et al., 2012; MIRANDA & FRAGA, 2006), com modificações. Para o preparo da solução pesou-se 0,0039g de DPPH para 100 mL de etanol absoluto envolvendo com papel alumínio para não absorver luz. A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico.

A técnica consistiu na incubação por 10 min de 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM com 500 µL da solução contendo concentrações decrescentes (10 mg/mL até 0,0025 mg/mL) dos extratos de *P. major e P. tomentosa* nos diferentes solventes (n-hexano, diclorometano e etanol). A solução denominada controle foi preparada uma solução com 500 µL de DPPH e 500 µL etanol. Para a solução denominada branco foi utilizado somente o solvente etanol (sem amostra e sem DPPH). A mistura reacional foi agitada e deixada em repouso (ao abrigo de luz) por 30 min para que a reação se completasse. A determinação da absorbância foi realizada em

espectrofotômetro UV-Visível (Logen Scientific UV/VIS - LS7052) em comprimento de onda de 515 nm.

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 1.

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] \div Abs_{controle}\} \quad (1)$$

Onde, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra, Abs_{branco} é a absorbância do branco e, $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle.

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, foi calculada a concentração de extrato necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC_{50}) por análise de regressão linear (SILVESTRI et al., 2010). Os resultados foram expressos pela média aritmética dos valores obtidos em três repetições.

4.9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido (PIEROZAN et al., 2009). A determinação da CIM foi realizada sobre bactérias Gram-negativas (*Salmonella choleraesuis* - ATCC 10708 e *Escherichia coli* - ATCC 25922) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* - ATCC 7644) as quais foram previamente crescidas em caldo Luria Bertani (LB - 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) a 37 °C por 24 h.

Após este período, 10 µL de culturas ativas (10^8 UFC/mL) foram inoculadas em poços de microplacas de fundo chato, contendo caldo LB e diferentes concentrações dos extratos das duas espécies de sementes de tansagem, totalizando um volume final de 310 µL por poço. Cada concentração de extrato foi avaliada em triplicada e como branco e controle foram avaliados poços contendo apenas meio de cultura e meio de cultura com o micro-organismo, respectivamente.

Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa (Fanem®, modelo 320-SE) a 37 °C por 24 h. Antes e após o período de incubação, 0 e 24 h, respectivamente, foi realizada a leitura da microplaca, utilizando-se o leitor automático de microplacas (Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. A CIM foi determinada como a menor concentração de extrato que não gerou alteração na turbidez, obtida pela diferença entre as leituras inicial e após 24 h.

4.10. Determinação da Toxicidade

Cistos de *Artemia salina* foram colocados em recipiente de vidro com solução salina artificial (10 g de sal marinho/1 L de água destilada/0,7 g de bicarbonato de sódio) com iluminação artificial, sob aeração e controle da temperatura (24 °C) para a eclosão dos cistos. Após 24 h de incubação, as larvas foram retiradas para o ensaio por sucção, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Para os bioensaios de letalidade utilizando os extratos das duas espécies de tansagem em diferentes solventes, foram avaliadas concentrações crescentes (10 a 1000 µg/mL de solução salina artificial).

Após a incubação, 40 náuplios de *A. salina* foram colocados em placas de Petry juntamente com 20 mL de cada concentração de extrato das duas espécies de tansagem, em triplicata. O controle avaliado consistia apenas em solução salina artificial e os náuplios, visando ter a certeza de que a mortalidade observada dos náuplios de *A. salina* seja resultante da toxicidade ao composto e não devido à falta de alimentação (CARBALLO et al., 2002).

Após 24 h de exposição, foi realizada contagem dos náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentaram qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa por 10 s. Foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou mortalidade igual ou inferior a 10% da população. A determinação da concentração letal capaz de provocar 50% de mortalidade (CL_{50}) foi determinada por análise de regressão entre as concentrações e as taxas de mortalidade observadas.

4.11. Análise Estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste de *T* S*tudent* e Tukey com auxílio do software Statistic 5.0, ao nível de significância de 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição Centesimal das Sementes de Tansagem

Os resultados da composição centesimal das sementes de *P. major* e *P. tomentosa* em relação a umidade, proteína bruta, lipídeos, cinzas, fibra bruta e carboidratos totais são apresentados na Tabela 1. Pode-se observar valores similares de composição centesimal para as duas espécies de tansagem analisadas.

Tabela 1. Resultados da composição centesimal das sementes de tansagem.

Valores	*P. major*	*P. tomentosa*
Umidade (%)	10,51	9,47
Proteína bruta (%)	16,78	17,44
Lipídeos (%)	0,10	0,11
Cinzas (%)	2,96	3,86
Fibra bruta (%)	10,78	10,04
Carboidratos totais (%)	58,87	59,08

Em estudo realizado por Kobeasy et al. (2010) em sementes de *P. major,* foi encontrado um teor de 15,01% de proteína bruta, 1,45% de lipídeo, 7,14% de cinza, 26,9% de fibra bruta e 45,87% de carboidratos, as quais, segundo os autores, podem ser utilizadas para a alimentação humana. Comparando os resultados com o presente estudo verifica-se que os autores obtiveram um maior teor de lipídeo, cinza e fibras. Essa diferença nos constituintes pode ser devido a diferenças no genótipo e nas condições ambientais durante o desenvolvimento e amadurecimento dos grãos, safra e local onde foram obtidas as sementes (ROMERO-BARANZINI et al., 2006).

5.1.1. Minerais

O conteúdo de minerais (mg/g), em base seca, das sementes de tansagem *P. major* e *P. tomentosa* está apresentado na Tabela 2.

Pode-se observar que os teores de minerais não apresentaram diferença significativa (p>0,05) entre as amostras de *P. major* e *P. tomentosa*. Somente o K, que apresentou 0,819 mg/g para a *P. major* e 0,622 mg/g para a *P. tomentosa*, diferiu estatisticamente (p<0,05) entre as duas espécies de tansagem.

Tabela 2. Conteúdo de minerais (mg/g), em base seca, das sementes de tansagem *P. major* e *P. tomentosa.*

Mineral	**Símbolo**	***P. major* (mg/g)**	**P*. tomentosa* (mg/g)**
Cálcio	**Ca**	0,829^{a} ± 0,003	0,752^{a} ± 0,043
Manganês	**Mg**	0,505^{a} ± 0,026	0,337^{a} ± 0,005
Sódio	**Na**	1,539^{a} ± 0,165	1,424^{a} ± 0,085
Potássio	**K**	0,819^{a} ± 0,006	0,622^{b} ± 0,019
Zinco	**Zn**	0,079^{a} ± 0,001	0,060^{a} ± 0,009
Cobre	**Cu**	0,030^{a} ± 0,001	0,020^{a} ± 0,004
Cromo	**Cr**	0,007^{a} ± 0,003	0,006^{a} ± 0,001
Ferro	**Fe**	0,013^{a} ± 0,001	0,013^{a} ± 0,001
Magnésio	**Mn**	0,031^{a} ± 0,000	0,034^{a} ± 0,000

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo teste de t *student*.

Esses valores de minerais das sementes são menores que aos encontrados na folha, como reportado por Pereira et al., (2017) em *P. coronopus*, detectando teores de Ca: 14,0 mg/g; Mg: 6,34 mg/g; Na: 50,0 mg/g; Zn: 0,05 mg/g; Fe: 0,41 mg/g; Mn: 0,01 mg/g, para Cu, e Cr, o valor ficou abaixo do limite detectado.

Segundo De Lima e Neto (1991), os minerais extraídos das folhas da *P. major* em maiores quantidades foram K (2,83%), Ca (1,26%) e Mn (0,37%) e em menor quantidade o Cu (7 ppm), Fe (288 ppm), Mn (60 ppm) e Zn (33 ppm), o quais foram analisados a partir da incineração de folhas da planta e as concentrações foram determinadas com um espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer 2280.

De acordo com Guil-Guerrero (2001) e Amaglo et al. (2010) outras espécies de Plantago, nomeadamente *P. major*, *P. lanceolata* e *P. media* são fontes valiosas de aminoácidos e minerais, que podem contribuir para a sua utilização como ingrediente na nutrição humana.

5.2. Rendimento da Extração

Os resultados de rendimentos obtidos nas extrações usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para as duas espécies de tansagem estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento da massa do extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*.

Solventes	**Rendimento (%) (b.s.)**	
	P. major	***P. tomentosa***
n-hexano	$7{,}506^{a,A} \pm 0{,}806$	$4{,}877^{a,B} \pm 1{,}012$
Diclorometano	$1{,}730^{b,B} \pm 0{,}132$	$5{,}617^{a,A} \pm 0{,}602$
Etanol	$1{,}789^{b,A} \pm 0{,}145$	$1{,}806^{b,A} \pm 0{,}604$
Rendimento Total	**11,025 ± 0,704**	**12,923 ± 0,969**

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo Teste de Tukey e t *student*, respectivamente.

Pode-se observar um maior rendimento para o extrato de *P. major* com n-hexano (7,5%) diferindo estatisticamente ($p<0{,}05$) dos extratos com diclorometano e etanol. Para a *P. tomentosa* os maiores rendimentos foram obtidos nos extratos com o n-hexano (5,62%) e diclorometano (4,88%), não apresentando diferença significativa ($p>0{,}05$). Os resultados obtidos indicam, portanto, que as sementes de *P. major* possuem grande quantidade de compostos de polaridade baixa e pequena quantidade de compostos de polaridade intermediária a alta. Já as sementes de *P. tomentosa* possuem grande quantidade de compostos de polaridade baixa a intermediária, e pequena quantidade de compostos de polaridade alta.

De acordo com Kumoro & Singh (2009), matrizes vegetais contêm várias moléculas de diferentes grupos funcionais, de forma que é difícil predizer a solubilidade das mesmas em um solvente específico. A solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies em um sistema em relação a polaridade. Uma forma alternativa de considerar a solubilidade é usar o conceito de polaridade. A polaridade, por sua vez, pode ser definida como a habilidade que uma molécula tem de interagir fortemente com outras moléculas polares (MEZZOMO, 2008).

Comparando-se as duas espécies, verifica-se um maior rendimento para o extrato de *P. major* obtido em n-hexano, enquanto que para as extrações com diclorometano a *P. tomentosa* apresentou maior valor, apresentando diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$). Contudo nos extratos com etanol não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os morfotipos de tansagem. As diferenças de rendimento de extração por maceração podem ocorrer por variações no tipo de solvente, temperatura e tempo de extração, mas principalmente, por falhas na filtração do macerado, recuperando no extrato partículas não solúveis (OLIVEIRA et al., 2016).

Em relação ao rendimento total, a *P. tomentosa* obteve um melhor rendimento (12,92%) quando comparada com a *P. major* (11,02%). Esse rendimento pode ser considerado baixo quando comparado com a extração realizada por Fayera et al. (2018) em folhas de *P. lanceolata* que foi sequencialmente extraída em Soxhlet com solventes orgânicos, onde obtiveram um rendimento de 7,97% para o solvente éter de petróleo, 19,16% para clorofórmio/metanol (1:1) e 27,18% para metanol, respectivamente.

Os baixos rendimentos obtidos no extrato bruto e nas frações da maceração a frio se devem provavelmente ao uso de baixa temperatura no processo (25 ^{o}C), ao contrário do que acontece com a extração com Soxhlet (70 ^{o}C). Assim, a tensão superficial e viscosidade dos solventes permanecem relativamente altas, dificultando o acesso aos compostos solúveis da matriz e reduzindo o rendimento, mesmo que sejam utilizados os mesmos solventes que em extração Soxhlet (MEZZOMO, 2008).

5.3. Teor de Fenóis Totais

O teor de fenóis totais obtido nas extrações por maceração a frio usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para as duas espécies de tansagem pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de fenóis totais extraídos em extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em (mgEAG/g).

Solventes	**Fenóis totais (mgEAG/g)**	
	P. major	***P. tomentosa***
n-hexano	$25,107^{b,A} \pm 3,390$	$15,116^{cB} \pm 0,562$
Diclorometano	$12,794^{c,B} \pm 3,662$	$27,981^{a,A} \pm 3,883$
Etanol	$340,085^{a,A} \pm 25,064$	$21,193^{b,B} \pm 0,021$
Total	**377,986 ± 65,966**	**64,290 ± 8,169**

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo Teste de Tukey e t *student*, respectivamente.

Pode-se observar uma maior concentração de fenóis (340,08 mg/g) para o extrato com etanol de *P. major* diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e diclorometano. Substâncias fenólicas têm maior afinidade por solventes polares como etanol e acetato de etila (SPAGOLLA et al. 2009; TIWARI et al., 2011). Para a *P. tomentosa* a maior concentração de fenóis (27,98 mg/g) foi obtida no extrato com o diclorometano, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e etanol.

Comparando-se as duas espécies de tansagem, verifica-se uma maior concentração de fenóis na *P. major* para o extrato com etanol (340,08 mg/g). Na *P. tomentosa* a concentração maior de fenóis foi obtida no extrato com diclorometano (27,98 mg/g), diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos demais solventes.

Quando comparado o teor de fenóis totais nas duas espécies de sementes de tansagem, observa-se uma maior concentração na *P. major* (377,986 mg/g), enquanto que para a *P. tomentosa,* foi obtido (64,290 mg/g).

O excelente resultado de fenóis totais encontrado na *P. major* pode ser comparado a um estudo de Dudonné et al. (2009) que avaliou 30 diferentes plantas onde relatou que os extratos aquosos que apresentaram o maior teor fenólico (300-400 mg/g) foi o de carvalho (*Quercus robur*), pinheiro (*Pinus maritima*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), que possuíam os mais altos teores de fenóis totais obtidos através de maceração pelo método de Folin-Ciocalteu e, portanto, poderiam ser ricas fontes potenciais de antioxidantes naturais. Contudo, os compostos fenólicos são onipresentes nas plantas, mas cada planta contém diferentes misturas polifenólicas.

Também pode-se verificar que o teor de fenóis totais em sementes *P. major* do presente estudo são superiores aos melhores resultados das folhas (13,05 mg/g, maceração em etanol) e das sementes de (7,43 mg/g, maceração em etanol) encontrados por Kobeasy et al. (2010), que avaliaram o teor de fenóis totais obtidos através de maceração em água fria, água quente e etanol pelo método de Folin-Ciocalteu.

Souri et al. (2008) relataram que o teor de fenóis obtidos através de maceração pelo método de Folin-Ciocalteu encontrados nas sementes *P. major* foi de 6,73 mg/g e *P. ovata* de 2,49 mg/g onde enquadraram em três grupos: alto (> 3,00 mg/g), moderado (1,00-3,00 mg/g) e baixo (<1,00 mg/g). Já para Ksouri et al. (2012); Rodrigues et al. (2015), os extratos naturais são classificados como ricos em compostos fenólicos quando seus valores de teor de fenóis totais (expressos como mgEAG/g) são superiores a 20 mg/g.

A concentração dos compostos fenólicos varia muito com o solvente usado para a extração. Yilmaz e Toledo (2006) realizaram extrações por maceração a 60 °C por 5 horas em pó das sementes de uva a partir de espécies de *Vitis vinifera* (Merlot e Chardonnay) e *Vitis rotundifolia* (Muscadine), utilizando água pura, etanol puro e etanol com diferentes proporções de água (10, 20, 30, 40, 50 e 60%). Uma mistura de etanol e água revelou-se mais eficiente que a água ou o etanol separadamente.

Globalmente, as folhas apresentaram o maior teor de todos os grupos fenólicos, um padrão de acumulação possivelmente ligado ao papel fenólico na sobrevivência fisiológica das plantas, uma vez que fenólicos e flavonóides, em particular, podem agir como filtros UV protegendo os tecidos fotossintéticos nas folhas, a maior área exposta à radiação (HARBORNE & WILLIAMS, 2000 *apud* PEREIRA et al., 2017). A polaridade dos solventes define a composição dos extratos obtidos e o metanol é conhecido por sua afinidade com uma ampla diversidade de compostos bioativos, a saber fenólicos (KHODDAMI et al., 2013).

5.4. Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonóides totais expressos em mg equivalente de quercitina por grama de semente (mgEQ/g) obtido nas extrações por maceração a frio usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para as duas espécies de tansagem estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de flavonóides totais extraídos em extrato usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos (mgEQ/g).

Solventes	**Flavonóides totais (mgEQ/g)**	
	P. major	***P. tomentosa***
n-hexano	$43{,}009^{c,A} \pm 7{,}648$	$37{,}866^{b,A} \pm 3{,}439$
Diclorometano	$54{,}352^{b,B} \pm 0{,}418$	$87{,}287^{a,A} \pm 8{,}661$
Etanol	$114{,}063^{a,A} \pm 11{,}075$	$31{,}551^{b,B} \pm 6{,}624$
Total	**211,423 ± 31,711**	**156,704 ± 8,046**

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo Teste de Tukey e t *student*, respectivamente.

Pode-se observar uma maior concentração de flavonóides (114,06 mg/g) para o extrato de *P. major* em etanol, diferindo estatisticamente ($p<0{,}05$) dos extratos com n-hexano e diclorometano, comprovando assim que extrações com etanol são eficientes em arraste de flavonóides

(CECHINEL FILHO, 1998). Para a *P. tomentosa* os maiores teores de flavonóides (87,29 mg/g) foram obtidos no extrato com o diclorometano, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e etanol.

Comparando-se as duas espécies de tansagem, verifica-se uma maior concentração de flavonóides na *P. major* para o extrato com etanol (114,063 mg/g). Na *P. tomentosa* a concentração maior de flavonóides foi obtida no extrato com diclorometano (87,287 mg/g), diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos demais solventes, bem como do extrato etanólico da *P. major*.

Quando comparado o teor de flavonóides totais nas duas espécies de sementes de tansagem, observa-se uma maior concentração na *P. major* (211,423 mg/g), enquanto que para a *P. tomentosa,* foi obtido 156,704 mg/g.

Teores esses muito superiores aos relatados por Kobeasy, et al., (2010) que encontraram concentrações de flavonóides nas folhas (6,41 mg/g) e sementes (3,03 mg/g) de *P. Major*, obtidos através de maceração utilizando como solvente o etanol. Já no estudo realizado por Gálvez et al. (2005) em extratos metanólicos de folhas secas e em pó de cinco espécies de Plantago (*P. afra, P. coronopus, P. lagopus, P. lanceolata e P. serraria*) foram extraídas por Soxhlet por 48 h com metanol, os autores relatam que o conteúdo de flavonóides encontrado variou entre 0,69 a 3,09 mg/100g.

Para Pereira et al. (2017), os flavonóides também foram os principais constituintes de quase todos os extratos de *P. coronopus*, variando de 0,10 mgEQ/g no extrato hexânico das raízes até 146 mgEQ/g no extrato metanólico das folhas obtidos por maceração e extraídos sequencialmente com solventes de polaridade crescente (acetato de etilo, metanol e água). As diferenças observadas podem estar relacionadas a diferentes procedimentos de extração e/ou métodos analíticos utilizados, ou tempo de colheita e características ambientais que também podem influenciar a concentração de compostos em Plantago. No entanto, os flavonóides são uma das classes mais características de compostos nas espécies de Plantago (KSOURI et al., 2012).

O excelente valor de fenóis totais obtidos nesse estudo deve-se ao método de extração utilizado. A vantagem da extração sequencial é que, como os compostos tem mais afinidade por determinado solvente, usando

mais de um solvente com polaridade diferente, os compostos não desejados serão extraídos em outro solvente, fazendo assim, uma seleção natural (faxina), restando os compostos desejados, como é o caso do n-hexano, do acetato de etila e do etanol que são solventes capazes de extrair compostos fenólicos, flavonóicos e terpenos (PATEL et al., 2016). Também na extração fracionada obtém-se um melhor rendimento do extrato, pois ao se aplicar o fracionamento dos solventes, evita-se a saturação dos mesmos, reduzindo assim o tempo de extração bem como melhorando seu desempenho.

5.5. Taninos Totais

O teor de taninos totais obtido nas extrações por maceração a frio usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para as duas espécies de tansagem estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de taninos totais extraídos com n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*.

Solventes	**Taninos totais (g/100g)**	
	P. major	***P. tomentosa***
n-hexano	$0,993^{c,A} \pm 0,004$	$0,170^{c,B} \pm 0,007$
Diclorometano	$1,871^{a,A} \pm 0,017$	$0,231^{b,B} \pm 0,020$
Etanol	$1,726^{b,A} \pm 0,008$	$0,687^{a,B} \pm 0,002$
Total	**4,590**	**1,088**

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo Teste de Tukey e t *student*, respectivamente

Pode-se observar uma maior concentração de taninos (1,871g/100g) para o extrato de *P. major* em diclorometano, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e etanol. Para a *P. tomentosa* os maiores teores de taninos (0,687 g/100g) foram obtidos no extrato com o etanol, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e diclorometano.

Comparando-se as duas espécies de tansagem, verifica-se uma maior concentração de taninos na *P. major* para o extrato com diclorometano (1,871 g/100g) diferindo da *P. tomentosa* que apresentou maior teor (0,687 g/100g) para o extrato de etanol. Quando comparado o teor de taninos totais nas duas espécies de sementes de tansagem, observa-se uma concentração 4,2 vezes maior na *P. major* em relação a *P. tomentosa.* Teores esses bem acima aos relatados por Kobeasy et al. (2010) que encontraram concentrações de taninos nas sementes de *P. major* de 243 mg/100g obtidos através de maceração utilizando como solvente o etanol.

Comparando-se os resultados obtidos com os dados de literatura (TRUGILO et al., 1997), pode-se observar que os extratos da semente da tansagem apresentaram um rendimento baixo, visto que espécies conhecidas pelos seus elevados teores de taninos, apresentam até 20g/100g de taninos totais, como é o caso da goiabeira (*Psidium guajava*: 13 a 17g/100g) e do araçá-pitanga (*Psidium ruum:* 20g/100g). A *Acacia mearnsii* (acácia-negra) é uma das espécies com maior potencial para a utilização industrial da casca na produção de taninos, apresentando 14g/100g de taninos totais na casca (PANSERA et al., 2001).

Em estudo realizado por Grubesic et al. (2005) foi aplicado o procedimento espectrofotométrico de UV-Vis com o reagente de Folin-Ciocalteu para determinação de taninos totais em folhas, caules e flores de espécies de Plantago (não especificada espécie), cultivadas na Croácia. Os resultados mostraram um teor de taninos nas hastes de 0,28g/100g a 1,0g/100g, enquanto as folhas e flores continham taninos nas concentrações de 2,26g/100g a 2,21g/100g, respectivamente.

5.6. Atividade Antioxidante

Os resultados de atividade antioxidante obtidos nas extrações por maceração a frio usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para as duas espécies de tansagem utilizando radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) expressos IC_{50} (mg/mL) estão apresentados na Tabela 7.

Uma curva de atividade antioxidante de cada extrato das sementes de tansagem está apresentada no Apêndice IV.

Pode-se observar que a extração com etanol da semente de *P. major* apresentou a melhor atividade antioxidante (IC_{50} de 0,019 mg/mL) diferindo estatisticamente ($p<0,05$) dos extratos com n-hexano e diclorometano bem como dos extratos de *P. tometosa*. Essa concentração pode ser comparada com antioxidantes por excelência, como o ácido ascórbico (IC_{50} = 0,002 mg/mL), e o BHT (IC_{50} = 0,005 mg/mL) (KUNFER, 2010), que são antioxidantes comerciais. O resultado encontrado está de acordo com Kobeasy et al. (2010) que observou que os extratos de etanol das folhas e sementes da *P. major* possuem mais atividade antioxidante que os demais extratos com água fria e água quente.

Tabela 7. Atividade antioxidante de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em IC_{50} (mg/mL).

Solventes	**IC_{50} (mg/mL)**	
	P. major	***P. tomentosa***
n-hexano	$32,965^{a,A} \pm 2,984$*	$30,189^{a,A} \pm 6,448$
Diclorometano	$2,534^{b,A} \pm 0,519$	$0,139^{c,B} \pm 0,015$
Etanol	$0,019^{c,B} \pm 0,001$	$0,169^{b,A} \pm 0,009$

Média ± desvio padrão; letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha correspondem a diferença estatística ao nível de 5% pelo Teste de Tukey e t *student*, respectivamente.
*Este resultado foi estimado pela extrapolação da curva de atividade antioxidante

Este estudo também apresenta um valor de IC_{50} melhor que ao relatado por Mensor et al. (2001), na planta *Ginkgo biloba,* que é considerada uma das plantas com alta atividade antioxidante, apresentando um IC_{50} de 0,04 mg/mL.

Em outro estudo realizado por Souri et al. (2008) foram pesquisadas 24 plantas quanto a sua atividade antioxidante, onde os extratos foram obtidos por maceração em metanol, relataram que enquanto o pepino (*Cucumis sativus*) tem uma baixa atividade antioxidante, a semente dele mostrou uma atividade antioxidante excepcional (IC_{50} = 0,00125 mg/mL), que foi cerca de

dez vezes maior do que α-tocoferol (vitamina E) (IC_{50} = 0,015 mg/mL). Segundo Souri et al. (2008) a atividade antioxidante apresentada em IC_{50} é dividida em 3 grupos: alto (IC_{50} <0,02 mg/mL), moderado (0,02 mg/mL< IC_{50} <0,075 mg/mL) e baixo (IC_{50}> 0,075 mg/mL). Segundo esta classificação, o extrato de etanol da *P. major* deste estudo apresentou uma alta atividade antioxidante, apresentando um IC_{50} (0,019 mg/mL).

A excelente atividade antioxidante expresso pelo IC_{50} (0,019 mg/mL) encontrado no extrato de etanol das sementes de *P. major* sugere ser pelo fato da extração por maceração a frio ser sequencial, onde os solventes de n-hexano e diclorometano, que foram usados anteriormente, podem ter extraído outros compostos que tem mais afinidade por solventes com polaridade nula e intermediária, fazendo assim uma limpeza, restando somente compostos com maior afinidade ao etanol, solvente esse de polaridade alta, que contém maior afinidade por compostos que possuem atividade antioxidante.

Para a *P. tomentosa* a melhor atividade antioxidante (IC_{50} de 0,139 mg/mL) foi obtida no extrato com o diclorometano, diferindo estatisticamente (p>0,05) dos extratos com n-hexano e etanol.

Comparando-se as duas espécies de sementes de tansagem verifica-se uma melhor atividade antioxidante (com IC_{50} de 0,019 mg/mL) para o extrato com etanol na *P. major*, enquanto que para a *P. tomentosa*, a melhor atividade antioxidante (com IC_{50} de 0,139 mg/mL) foi obtida com o extrato com diclorometano, diferindo estatisticamente dos demais solventes. Contudo no extrato com n-hexano não foi observada diferença significativa entre as duas espécies.

Os resultados obtidos estão de acordo com Gálvez et al. (2005), Souri et al. (2008) e Beara et al. (2009) que examinaram espécies de Plantago quanto à atividade antioxidante e relataram que ela poderia ser considerada como uma possível nova fonte de antioxidantes naturais. Amić et al. (2003) avaliaram a atividade antioxidante de toda a planta de *P. major* extraída em metanol. Os resultados mostraram que uma concentração de 0,8 mg/g apresentou 89,3 ± 1,5% de atividade sequestradora. Os compostos responsáveis que têm a propriedade de eliminação contra DPPH são provavelmente os grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos de *P.*

major. Outro componente químico que pode ser responsável pela atividade sequestradora são os flavonóides. Eles possuem um anel β ocupado com 3′, 4′-di-hidroxi e/ou grupo 3-OH que pode atrair e diminuir os radicais de oxigênio em substâncias neutralizadas como água (KOBEASY, et al., 2010).

No estudo realizado por Gálvez et al. (2005) em extratos metanólicos com solvente de butanol/ácido acético/água (40:10:50), onde cinco espécies de Plantago (*P. afra, P. coronopus, P. lagopus, P. lanceolata e P. serraria*) foram avaliadas em cromatografia em camada fina (TLC) obtiveram uma excelente atividade antioxidante para a *P. serraria* (IC_{50} de 0,0076 mg/mL), seguidos de (IC_{50} de 0,03086 mg/mL) para a *P. lanceolata*, (IC_{50} de 0,03131 mg/mL) para a *P. lagopus,* (IC_{50} de 0,04743 mg/mL) para a *P. coronopus* e (IC_{50} de 0,08522 mg/mL) para a *P. afra.* Os extratos de ambas as sementes obtidos com o solvente n-hexano não apresentaram atividade antioxidante.

5.7. Atividade Microbiana (CIM)

Os resultados de atividade microbiana, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos nas extrações por maceração a frio usando diferente solventes (n-hexano, diclorometano e etanol) para as duas espécies de tansagem utilizado o método indireto de crescimento bacteriano, mediante a densidade ótica em meio de cultura líquido expressos em mg/mL estão apresentados na Tabela 8.

Verificou-se que os extratos das sementes de tansagem possuem boa eficácia de CIM frente às bactérias Gram-negativas *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 25922, e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

A amostra de *P. major* com o extrato diclorometano apresentou melhor eficácia frente às bactérias Gram-negativas *S. choleraesuis* e *E. coli*, a qual apresentou uma CIM inferior a 1,239 mg/mL, seguido de n-hexano com CIM 1,288 mg/mL para ambas bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Já para a *P. tomentosa* a CIM menor foi em extrato de n-hexano para *L. monocytogenes* apresentando uma CIM de 1,624 mg/mL, seguido de etanol para para as bactérias *S. Aureus* e *S. choleraesuis,* com CIM de 1,765 mg/mL. Também

pode-se observar que os resultados encontrados no estudo ficaram muito próximos entre os diferentes extratos e também em relação as duas espécies de sementes, ficando entre 1,288 mg/mL e 3,746 mg/mL para a *P. major,* enquanto que para a *P. tomentosa* os valores obtidos ficaram entre 1,624 mg/mL e 3,615 mg/mL.

Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e P. *tomentosa*, expressos em CIM (mg/mL).

Micro-organismo	**CIM (mg/mL)**		
	Solventes		
	n-hexano	**Diclorometano**	**Etanol**
		P. major	
S. aureus	1,288	2,479	2,126
E. coli	1,288	1,239	2,126
L. monocytogenes	1,288	3,746	2,126
S. choleraesuis	1,288	1,239	2,126
		P. tomentosa	
S. aureus	3,249	3,615	1,765
E. coli	2,436	1,807	2,354
L. monocytogenes	1,624	1,807	2,354
S. choleraesuis	2,436	1,807	1,765

Esses valores podem ser comparados com o ensaio realizado por Ünsal et al. (2010), onde a amostra mais ativa foi o extrato etanólico de *P. major*, o qual apresentou CIM igual a 0,01952 mg/mL frente a *S. aureus.* Frente aos outros micro-organismos, os valores de CIM foram: 0,625 mg/mL para *S. epidermidis* e *C. albicans*. O extrato éter de petróleo apresentou valores de CIM de 0,1562 mg/mL para *S. aureus*; 0,3125 mg/mL *S. epidermidis*; 0,625 mg/mL para *S. flexneri* e *C. albicans*. Ambos extratos foram pouco ativos para a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e inativos para a *P. aeroginosa*.

Em outros estudos, foi observado que o extrato de éter de petróleo das folhas de *P. major* foi ativo frente à *E. coli,* apresentando valor de CIM igual a 0,3125 mg/mL (UZUN et al., 2004). Ainda, o extrato etanólico demonstrou leve atividade frente à *Pseudomonas vulgaris*, com halo de inibição igual a

7,33 mm (PEHLIVAN et al., 2012); e moderada inibição do crescimento de *E. coli* (42,5 mg/mL) e de *B. cereus* (42,5 mg/mL) (METINER et al., 2012).

Vargas Neto (2004) avaliou o extrato etanólico de folhas e flores de *P. major* frente a diferentes cepas de *Candida*: *C. albicans, C. tropicallis, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. krusei* e *C. kerfyr*. O crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* foi completamente inibido pelo extrato de tansagem. O extrato foi fracamente ativo frente a *C. guilliermondii*, não sendo ativo frente às cepas de *C. parapsilosis, C. krusei* e *C. kerfyr*.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas da planta apresentaram efeito moderado frente a *Candida krusei* (0,125 mgmL), fraca inibição do crescimento de *S. aureus* e *C. tropicalis* (1 mg/mL), não sendo ativos contra *C. parapsilosis, B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa* (HOLETZ et al., 2002), *C. albicans* (HOLETZ et al., 2002; HUAMANI & QUEIROZ, 2005) e *Aspergillus niger* (>1 mg/mL) (HUAMANI & QUEIROZ, 2005).

Velasco-Lezama et al., (2006) analisaram a capacidade antimicrobiana dos extratos aquoso, metanólico, clorofórmico e hexânico das partes aéreas de *P. major*, frente à *E. coli, B. subtilis* e *C. albicans*. O crescimento de *B. subtilis* foi inibido pelo extrato aquoso de 78 a 21%, nas concentrações de 400 a 25 mg/mL. O extrato hexânico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli*, o qual variou de 94 a 37%, nas mesmas concentrações. O extrato metanólico inibiu fracamente o crescimento de *B. subtilis* e o extrato clorofórmico inibiu fracamente o crescimento de *E. coli*.

Também, Velasco-Lezama et al. (2006) verificou que as atividades antibacterianas de folhas e sementes de *P. major* em água, metanol, clorofórmio e extratos de hexano foram positivos para *E. coli*, *B. subtilis* e culturas de *C. albicans* em diferentes faixas. Além disso, um estudo conduzido por Sharifa et al. (2012) testou toda a planta de *P. major* em extratos aquosos de metanol e etanol em *B. subtilis, S. aureus, C. albicans, C. tropicalis* e *E. coli*. Os resultados mostraram que os extratos de metanol e etanol demonstraram atividade bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram-negativas em concentrações de 100-200 mg/mL, mas não houve atividade. Isso foi provado usando a observação por microscopia.

Outro estudo conduzido por Metiner et al. (2012) examinou a atividade antibacteriana das folhas de *P. major* extraídas em acetona e etanol usando o método do líquido de macrodiluição (tubo). Ambos os extratos foram estudados em nove espécies de bactérias (*E. coli, B. cereus, B. subtilis, S. epidermidis, S. aureus, P. aeruginosa, K. pneumonia, S. enteritidis e P. mirabilis)*. Os resultados mostraram que o extrato de etanol foi eficaz apenas contra *E. coli* e *B. cereus*. Em contraste, o extrato de acetona de *P. major* mostrou efeito em todas as nove espécies de bactérias com diferentes concentrações.

5.8. Toxicidade

Os resultados para toxicidade obtidos nas extrações por maceração a frio usando diferente solventes (n-hexano, diclorometano e etanol) para as duas espécies de tansagem frente aos náuplios da *Artemia salina* em meio de cultura líquido expressos em percentual de mortalidade nas concentrações de 10 a 1000 µg/mL estão apresentados na Tabela 9.

Podese observar que apenas o extrato de n-hexano da *P. tomentosa* apresentou 100% de mortalidade na concentração 250 µg/mL. As outras concentrações (10 a 150 µg/mL) do extrato demonstraram uma mortalidade de 19,32 a 92,09% indicando assim, sua toxicidade frente aos náuplios da *A. salina*. Já para a *P. major*, o percentual de mortalidade avaliado até a concentração 1000 µg/mL (que foi a maior concentração avaliada) foi de 73,125%. As outras concentrações (10 a 750 µg/mL) do extrato demonstraram uma mortalidade de 0,840 a 54,762%.

Para o extrato de diclorometano, a porcentagem de mortalidade variou entre 1,186 e 17,167% para a *P. major* nas concentrações 100 a 1000 µg/mL e para a *P. tomentosa*, ficou entre 3,185 e 5,921% nas concentrações 100 a 1000 µg/mL demonstrando assim, não apresentar toxicidade, também não sendo possível calcular a concentração de letalidade (CL_{50}), pois não apresentaram mortalidade superior a 50% dos náuplios da *A. salina*.

O extrato de etanol apresentou a menor mortalidade entre os solventes estudados, com valores de 0,844 e 5,532% para a *P. major* nas

concentrações 750 e 1000 µg/mL e para a *P. tomentosa* o percentual de mortalidade ficou entre 1,914 e 3,185% nas concentrações entre 100 µg/mL a 1000 µg/mL, demonstrando assim, não haver toxicidade no extrato de etanol, também não sendo possível calcular a concentração de letalidade (CL_{50}) pois não apresentaram mortalidade superior a 50% dos náuplios da *A. salina*. Na ausência de extrato não foi observada mortalidade (Branco).

Tabela 9. Toxicidade de extratos usando os solventes n-hexano, diclorometano e etanol para *P. major* e *P. tomentosa*, expressos em percentual (%) de mortalidade.

Concentração (µg/mL)	**Mortalidade (%)**		
	Solventes		
	n-hexano	**Diclorometano**	**Etanol**
	P. major		
0	0	0	0
10	0,840	n.a.	n.a.
25	5,628	n.a.	n.a.
50	18,623	n.a.	n.a.
75	21,930	n.a.	n.a.
100	30,712	1,186	0,000
250	34,579	0,000	0,000
500	44,444	0,800	0,000
750	54,762	2,252	0,844
1000	73,125	17,167	5,532
	P. tomentosa		
0	n.a.	0,000	0,000
10	19,318	n.a.	n.a.
25	43,446	n.a.	n.a.
50	64,528	n.a.	n.a.
75	n.a.	n.a.	n.a.
100	86,905	3,185	1,914
150	92,086	3,165	2,597
250	100,000	n.a.	n.a.
500	n.a.	4,575	4,787
750	n.a.	2,597	1,987
1000	n.a.	5,921	3,185
Branco		0,506	

n.a. - Concentração não avaliada.

Mirzaei et al., (2013) avaliaram a citotoxicidade e a letalidade dos extratos n-hexano, acetato de etila e metanol de *P. major* a 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Foram utilizados camarões de água salgada (*Artemia salina*) para os testes. Água salgada artificial e timol foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Todos os extratos apresentaram mortalidade (100%) a 1000 µg/mL. As outras concentrações do extrato demonstraram uma mortalidade de 10 a 72%.

Os resultados para toxicidade obtidos nas extrações por maceração a frio usando diferente solventes (n-hexano, diclorometano e etanol) para as duas espécies de tansagem frente aos náuplios da *Artemia salina* em meio de cultura líquido que apresentaram mortalidade superior a 50%, expressos em concentração de letalidade (CL_{50}) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Toxicidade de extratos em n-hexano que apresentaram mortalidade superior a 50%, expressos em concentração de letalidade (CL_{50}).

CL_{50} (µg/mL)	**n-hexano**
P. major	621,746
P. tomentosa	58,886

Pode-se observar que, para o extrato de n-hexano da *P. tomentosa* a CL_{50} foi menor que a *P. major*, indicando maior toxicidade do extrato de n-hexano da *P. tomentosa*, com o percentual máximo de mortalidade (100%) para a concentração de 200 µg/mL.

A concentração letal mediana (CL_{50}) é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% da população teste e segundo Meyer et al. (1982) são consideradas bioativas/tóxicas substâncias que apresentam CL_{50} abaixo de 1000 µg/mL em *Artemia Salina*. Uma baixa CL_{50} indica que o extrato é altamente letal e que o extrato da planta pode conter compostos citotóxicos potentes (OGUNNUSI & DOSUMU, 2008).

Desta forma, segundo a classificação de Meyer et al. (1982), o extrato de n-hexano da *P. tomentosa* deve ser considerado com toxicidade frente aos náuplios da *A. salina* (CL_{50} = 58,886 µg/mL).

Já para o mesmo extrato, porém da *P. major*, o percentual de mortalidade avaliado até a concentração 1000 µg/mL, utilizando a equação da reta, apresentou um valor para CL_{50} de 621,746 µg/mL, demonstrando que, também o extrato de n-hexano, embora numa toxicidade muito menor, é toxico frente aos náuplios da *A. salina*.

O valor encontrado pode ser comparado ao estudo realizado por Mirzaei et al. (2013), que avaliaram a citotoxicidade e a letalidade dos extratos n-hexano, acetato de etila e metanol das folhas de *P. major* a 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Foram utilizados camarões de água salgada (*Artemia salina*) para os testes. Todos os extratos apresentaram mortalidade (100%) a 1000 µg/mL. O extrato acetato de etila foi o mais potente e apresentou a maior porcentagem de mortalidade com os menores valores de CL_{50} de 262 µg/mL. Após acetato de etila, o extrato hexânico apresentou a maior toxicidade com valor de CL_{50} de 290 µg/mL. O extrato metanólico apresentou a menor mortalidade com os maiores valores de CL_{50} de 321,6 µg/mL. Segundo os autores, estes extratos podem ser considerados tóxico para células tumorais e normais.

Os baixos níveis de CL_{50} obtidos a partir dos diferentes extratos de *P. major* estão associados às suas tradicionais utilizações medicinais antitumorais, anti-helmínticas, antivirais e anti-reumáticas (FRANCA et al., 1996). Esses baixos valores de CL_{50} estão relacionados a substâncias tóxicas, como flavonóides, flavonas e luteolina, presentes nesta planta (KOBEASY et al., 2011). *P. major* demonstrou propriedades inibitórias e citotóxicas do crescimento em diferentes tumores malignos, leucemia mielocítica aguda e adenocarcinoma mamário (GÁLVEZ et al., 2003, KOBEASY et al., 2011). Além disso, esta planta apresenta atividade antibacteriana (GOMEZ et al., 2000).

Também, a tintura das folhas de *P. major*, contendo 49% de teor alcoólico, foi avaliada em estudo *in vitro*, frente à *A. salina*, como teste alternativo para determinação da toxicidade de produtos naturais. As larvas vivas foram contadas e a CL_{50} foi estimada. As concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL da tintura causaram mortalidades de 5,7; 9,3 e 10, respectivamente, sendo o valor de 10 correspondente a 100% mortalidade. O

valor encontrado de CL_{50} para a tintura foi de 4,74 µg/mL. A mesma tintura foi avaliada por metodologia *in vivo*, administrando-a em camundongos albinos, em dose única, administrada por via oral. A CL_{50}, após 24 horas do início do tratamento, foi de 182,54 mg/kg. Foi estabelecida boa correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (r = 0,85) (LAGARTO et al., 2001).

Os resultados de composição nutricional das sementes das duas espécies de tansagem estudas (*P. major* e *P. tomentosa*) e das análises de atividade antioxidante, fenóis totais, flavonoides totais e atividade antimicrobiana dos seus extratos foram promissores, com destaque para o extrato macerado com etanol e em especial para a *P. major*. Este potencial é confirmado, principalmente visto que, os extratos obtidos, exceto para n-hexano, não apresentaram toxicidade frente a *A. salina*, sugerindo uma possível aplicação nutricional e na área de segurança de alimentos.

6. CONCLUSÃO

As sementes de tansagem estudas (*P. major* e *P. tomentosa*) apresentaram uma composição centesimal similar e com potencial nutricional, confirmando uma possível aplicação na alimentação humana (PANC) ou animal, visto a presença de proteínas, carboidratos, lipídeos, fibras e minerais, como Ca, Mg, Na, K, Zn, Fe e Mn. Na composição centesimal das sementes obteve-se 10,51 e 9,47% de teores de umidade, 16,78 e 17,44% de proteína bruta, 0,10 e 0,11% de lipídios, 58,87 e 59,08% de carboidratos totais, 2,98 e 3,86% de cinzas brutas e 10,78 e 10,04% de fibra bruta para *P. major e P. tomentosa*, respectivamente.

Os extratos das sementes da *P. major* obtidos por extração fracionada e sequencial com solventes de diferentes polaridades (n-hexano, diclorometano e etanol) apresentaram maiores teores de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante quando comparado aos demais extratos da *P. tomentosa*. Em relação aos extratos, quanto ao teor de fenóis totais, obteve-se uma maior concentração na *P. major (*377,98 mgEAG/g) em comparação com a *P. tomentosa* (64,29 mgEAG/g). Para o teor de flavonóides totais, obteve-se uma maior concentração na *P. major* (211,42 mgEQ/g) em relação a *P. tomentosa* (156,70 mgEQ/g). E para taninos totais obteve-se um teor de 4.590 mg/100g para a *P. major* e 1.088 mg/100g para a *P. tomentosa*. Já na atividade antioxidante, a extração com etanol da *P. major* apresentou o melhor IC_{50} de 0,019 mg/mL. Em *P. tomentosa*, o melhor valor de IC_{50} foi de 0,139 mg/mL no extrato diclorometânico.

Também apresentaram baixa CIM para as bactérias *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. choleraesuis* e não apresentaram toxicidade frente aos náuplios da *A. salina* para os extratos de diclorometano e etanol. Somente o extrato de n-hexano demostrou toxicidade para as duas espécies de tansagem. Verificou-se que os extratos das sementes de tansagem possuem boa concentração inibitória mínima (CIM) para todos os extratos (n-hexano, diclorometano e etanol). Os extratos de diclorometano e etanol de ambas as sementes não apresentaram toxicidade frente à larva da *Artemia*

Salina. Somente os extratos de n-hexano apresentaram toxicidade, com CL_{50} de 58,88 µg/mL para a *P. tomentosa* e CL_{50} de 621,75 µg/mL para a *P. major*.

O uso da extração por maceração a frio fracionada e sequencial com solventes de diferentes polaridades das sementes da tansagem são uma alternativa para otimizar o processo de extração e obter atividades biológicas. *P. tomentosa* e, principalmente *P. major* se destacaram em relação ao teor de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, demonstrando assim, uma excelente oportunidade de utilizar sementes de uma planta, muitas vezes negligenciada, visto que os seus extratos, exceto para n-hexano, apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana, sem apresentar toxicidade frente a *A. salina*.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a concentração de ácidos graxos tipo ômegas nos extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades;

- Testar a atividade antimicrobiana frente a outros micro-organismos;

- Testar diferentes temperaturas e tempos de extração;

- Testar outros solventes para a extração por maceração a frio;

- Testar outros métodos de extração, comparando os extratos com os obtidos por maceração a frio;

- Aplicar os extratos obtidos em filmes.

- Aplicação das sementes em produtos panificados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD MA, MOLINA A, WENDEL GH, JUAN HIKAWCZUK VE, PELZER LE, MARÍA AO. Gastroprotective effects of *Plantago major* and metabolites in rats. Latin American Journal of Pharmacy. 2012;31(8):1203-1206.

AHMAD FB & HOLDSWORTH DK. Medicinal plants of Sabah, East Malaysia - Part I. Pharmaceutical Biology. 2003;41(5):340-346.

ALARCON-AGUILAR F, VEGA-AVILA E, ALMANZA-PEREZ J, VELASCO-LEZAMA R, VAZQUEZ-CARRILLO L, ROMAN-RAMOS R. Hypoglycemic effect of *Plantago major* seeds in healthy and alloxan-diabetic mice. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 2006;49:51-54.

ALBERTASSE PD, THOMAZ LD, ANDRADE MA. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2010;12(3):250-260.

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

AMAGLO NK, BENNETT RN, LO CURTO RB, ROSA EAS, LO TURCO V, GIUFFRIDA A, CURTO AL, CREA F & TIMPO GM. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree Moringa oleifera L. grown in Ghana. Food Chemistry. 2010;122(4):1047-1054.

AMIĆ D, DAVIDOVIĆ-AMIĆ D, BESLO, TRINAJSTIĆL N., Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, Croat. Chem. Acta. 2003;76 (1):55–61.

ANDRADE KS. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (Coffea arabica L.). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011:132.

ANTIBUS RK & SINSABAUGH RL. The extraction and quantification of ergosterol from ectomycorrhizal fungi and roots. Mycorrhiza. 1993;3(3):137-144.

ATTA AH & ABO EL-SOOUD K. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2004;95(2-3):235-238.

ATTA AH & MOUNEIR SM. Evaluation of some medicinal plant extracts for antidiarrhoeal activity. Phytotherapy Research. 2005;19(6):481-485.

AWENG ER, NUR H, MOHD NMA, NURHANAN MY AND SHAMSUL M. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Vitex Trifolia Var, Simplicifolia Associated with Anticancer, ISCA J. of Biolo. Sciences. 2012;1(3):65-68.

AZMIR J, ZAIDUL ISM, RAHMAN MM, SHARIF KM, MOHAMED A, SAHEMA F. JAHURUL MHA, GHAFOOR K, NORULAINI N.N, OMAR AKM. Techniques

for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of food engineering. 2013;117:426-436.

BACCHI O, LEITÃO FILHO HF, ARANHA C. Plantas invasoras de culturas. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1984:906.

BADSHAH L & HUSSAIN F. People preferences and use of local medicinal flora in district Tank, Pakistan. Journal of Medicinal Plants Research. 2011;5(1):22-29.

BAKKER MI, BAAS WJ, SIJM DTHM, KOLLÖFFEL C. Leaf wax of Lactuca sativa and Plantago major*. Phytochemistry*. 1998;47(8):1489-1493.

BARTON KE & BOWERS MD. Neighbor species differentially alter resistance phenotypes in Plantago. Oecologia. 2006;150(3):442-452.

BARWICK VJ. Strategies for solvent selection – a literature review. Trends in Analytical Chemistry. 1997;16(6):293-309.

BEARA IN, LESJAK MM, JOVIN ED, BALOG KJ, ANACKOV GT, ORCIĆ DZ, MIMICA-DUKIĆ NM. Plantain (Plantago L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants, J. Agric. Food Chem. 2009;57(1):9268–9273.

BRAKO L, ROSSMAN AY, FARR DF. 5. Scientific common names of 7000 vascular plants in the United States. American Phytopathological Society. St. Paul: Minnesota. 1995:294.

BRANTNER A & GREIN E. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. Jouranl of Ethnopharmacology. 1994;44:35–40.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Plantago major* L. (TANCHAGEM). Ação 20K5 (DAF/ SCTIE/ MS)/2012. Brasilia. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília: ANVISA. 2010.

BRAZ R, WOLF LG, LOPES GC, DE MELLO JCP. 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.

BRUNETON J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza. Espanha. Ed. Acribia. 1991;1:189-213.

CAMEJO-RODRIGUES J, ASCENSÃO L, BONET MÀ, VALLÈS J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal). Journal of Ethnopharmacology. 2003;89(2-3):199-209.

CAMPOS AM & LISSI EA. Evaluation of the antioxidant capacity of herbal teas by a procedure based on the bleaching of ABTS radical cations. Boletin de la Sociedad Chilena de Quimica. 1995;40:375–381.

CARBALLO JL, HÉRNANDEZ-INDA ZL, PÉREZ P, GARCÍA-GRÁVELALOS MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro citotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology. 2002;2:17.

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

CASTRO HG, CASALI VWD, BARBOSA LCA, CECON PR. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 1999;1:29.

CAVENDER A. Folk medical uses of plant foods in southern Appalachia, United States. Journal of Ethnopharmacology. 2006;108(1):74-84.

CECHINEL FILHO V & YUNES RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, São Paulo. 1998;21:99-105.

CHIANG LC, CHIANG W, CHANG MY, NG LT, LIN CC. Antiviral activity of Plantago major extracts & related compounds in vitro, Antiviral Res. 2002;55(1):53–62. systems & oxidative stress, Xenobiotica. 1994;24:689–699.

COLOMBO ML, ASSISI F, DELLA PUPPA T, MORO P, SESANA FM, BISSOLI M, BORGHINI R, PEREGO S, GALASSO G, BANFI E, DAVANZO F. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2010;7(2):417-425.

CORDEIRO CHG, SACRAMENTO LVS, CORRÊA MA, PIZZOLITTO AC, BAUAB TM. 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.

CORDEIRO CHG. Atividade biológica de gel dentifrício e enxagüatório bucal contendo extratos vegetais. Araraquara, São Paulo: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2005.

CORNARA L, LA ROCCA A, MARSILI S, MARIOTTI MG. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). Journal of Ethnopharmacology. 2010;125(1):16-30.

DE ALBUQUERQUE UP, MONTEIRO JM, RAMOS MA, DE AMORIM ELC. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 2007;110(1):76-91.

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

DE PAULA CC. 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.

DEGÁSPARI CH & WASZCZYNSKYJ N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. Revista Visão Acadêmica. 2004:33-40.

DENDEN S, BRAHAM W, GORCII ALOUI S, LAKHDAR R, KAHLOUN H, MAHDOUANI K. Biological analysis and clinical phytotherapy of asthma in a population in Central Tunisia. ISHS Acta Horticulturae. 2010:391-396.

DORIGENI PA, GHEDINI PC, ALMEIDA CE, ETHUR ABM, LOPES AMV, ZACHIA RA. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular, no município de São João do Polénesi, RS, Brasil. I- relação entre enfermidades e espécies utilizadas. Revista Brasileira Plantas Medicinais. Botucatu. 2001;4(1):69-79.

DUDONNÉ S, VITRAC X, COUTIÈRE P, WOILLEZ M, MÉRILLON JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;57:1768-1774.

EGOROV TA, GALKINA TG, BALASHOVA TA, ARSEN'EV AS, NIKONOROVA AK, BABAKOV AV. Phenolic glycoside isolated from seeds of the greater plantain (*Plantago major* L.). Doklady Biochemistry and Biophysics. 2004;396:132-135.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu Editora LTDA. 1988;4(1).

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu Editora LTDA. 2002;4(2).

FAYERA S, NEELAIAH BABU G, DEKEBO A, BOGALE Y. Phytochemical Investigation and Antimicrobial Study of Leaf Extract of Plantago lanceolata. Nat Prod Chem Res. 2018;6(2):311

FELDMANN, KA. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. Current Opinion in Plant Biology. 2001;4:162-167.

FELLOWS PJ. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática. Porto Alegre. Artmed. 2006:2.

FLEURENTIN J & PELT JM. Additional information for a repertory of drugs and medicinal plants of yemen. Journal of Ethnopharmacology. 1983;8(2):237-243.

FOLIN O & CIOCALTEAU VJ. Journal of Biological Chemistry.1927;73:424.

FRANCA F, LAGO EL, MARSDEN PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to Leishmania (Viannia) braziliensis in an endemic area of Bahia, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1996;29(3):229-232.

FREITAS AG, COSTA V, FARIAS ET, LIMA MCA, SOUSA IA, XIMENES EA. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002:64-65.

GÁLVEZ M, MARTÍN-CORDERO C, HOUGHTON PJ, AYUSO MJ. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from Plantago species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53(6):1927-1933.

GÁLVEZ M, MARTIN-CORDERO C, LOPEZ-LAZARO M, CORTES F, AYUSA MJ. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J. Ethnopharm.* 2003;88**:**125-130.

GARRIDO G, ORTIZ M, POZO P. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de F. Phil. *Lampaya medicinalis.* Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research. 2013;1(1):30-38.

GEANKOPLIS CJ. Transport processes and separations process principles. New Jersey: Prentice Hall. 2003:4.

GOMEZ FR, CALDERON CL, SCHEIBEL LW, TAMEZ-GUERRA P, RODRIGUEZ-PADILLA C, TAMEZ- GUERRA R. Immunoenhancing properties of *plantago major* leaf extract, *Phytother. Res*. 2000;14:617- 622.

GÓMEZ-ESTRADA H, DÍAZ-CASTILLO F, FRANCO-OSPINA L, MERCADO-CAMARGO J, GUZMÁN-LEDEZMA J, MEDINA JD, et al. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2011;7:27.

GORIN AG. Chemical investigation of the polysaccharides of the leaves of *Plantago major* L. - I. Analysis of the monosaccharide composition of the polysaccharide complex. Chemistry of Natural Compounds. 1965;1(5):232-235.

GRUBESIC RJ, VUKOVIĆ J, KREMER D, VLADIMIR-KNEŽEVIC S. Método espectrofotométrico para análise de polifenóis: pré-validação e aplicação em espécies de Plantago L. Pharm Biomed Anal. 2005;39(3-4):837-42.

GUIL-GUERRERO JL. Nutritional composition of *Plantago* species (*P. major* L., *P. lanceolata* L., and *P. media* L.). Ecology of Food and Nutrition. 2001;40(5):481-495.

HAGERMAN AE, ZHAO Y, JOHNSON S. Antinutrients and Phytochemicals in Food. 1997;12:209.

HALLIWELL B. The antioxidant paradox. Lancet. 2000;355:1179–1180.

HAMMERSCHMIDT PA & PRATT DE. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Sci. 1987;43:556-559.

HANDJIEVA N, SPASSOV S, BODUROVA G, SAADI H, POPOV S, PUREB O. Majoroside, an iridoid glucoside from *Plantago major*. Phytochemistry. 1991;30(4):1317-1318.

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.

HARBORNE JB & WILLIAMS CA. Advances in flavonoid research since. Phytochemistry. 2000;55:481-504.

HOFFMAN M, JIA Z, PEÑA MJ, CASH M, HARPER A, BLACKBURN II AR. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. Carbohydrate Research. 2005;340(11):1826-4180.

HOLETZ FB, NAKAMURA TU, DIAS FILHO BP, CORTEZ DAG, MELLO JCP, NAKAMURA CV. Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. Acta scientiarum. 2002;24(3):657-662.

HUAMANÍ AME & QUIROZ RJR. 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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008;4(1):1020.

IVANOVA D, GEROVA D, CHERVENKOV T, YANKOVA T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2005;96(1-2):145-150.

JAMILAH J, SHARIFA AA, SHARIFAH NRSA. GC-MS analysis of various extracts from leaf of *Plantago major* used as traditional medicine. World Applied Sciences Journal. 2012;17:67-70.

JESUS NA & SUCHARA EA. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. Revista Eletrônica da UNIVAR. 2013;10(2)89-95.

JURISIC GR, VUKOVIC J, KREMER D, VLADIMIR-KNEZEVIC S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on Plantago L. species. Journal of Pharmaceutical Biomedical analysis. 2005;39:837–842.

KAWASHTY SA, GAMAL-EL-DIN E, ABDALLA TMF & SALEH NAM. Flavonoids of plantago species in Egypt. Biochemical Systematics and Ecology.

1994;22(7):729–733.

KHODDAMI A, WILKES M, ROBERTS T. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules. 2013;18(2):2328-2375.

KINUPP VF. Plantas alimentícias não convencionais da região Metropolitana de Porto Alegre, RS. 2007. 562 f. (Tese de doutorado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Riqueza de plantas alimentíceas não convencionais na região metropolitana de Porto Alegre. 2007:2.

KOBEASY MI, OSAMA, ABDEL-FATAH M, EL-SALAM SMA, EL-OLA ZMM. Biochemical studies on Plantago major L. and Cyamopsistetragonoloba L. Int. J. Biodivers. Conserv. 2011;3(3):83–91.

KRISTEN L, GRANGER RS, GALLAGHER E, PATRICK FJ, RICHARD A. Comparison of seed phenolic extraction and assay methods. Methods in Ecology and Evolution. 2011;2:691–698

KSOURI R, KSOURI WM, JALLALI I, DEBEZ A, MAGNÉ C, HIROKO I & ABDELLY C. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(4):289-326.

KUFNER DE. Atividade antioxidante do extrato aquoso de manjerona (o*riganum majorana* l.), em linguiça frescal de frango. Tese (Doutorado) - Programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, Erechim – RS. 2010.

KUMORO AC, HASAN M, SINGH H. Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from Andrographis paniculata leaves*.* Science Asia. 2009;35(3):306-309.

LAGARTO PA, SILVA YR, GUERRA SI, IGLESIAS BL. 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.

LONG C, MOULIS C, STANISLAS E, FOURASTE I. Aucuboside and catapol in *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L., *Plantago media* L. leaves. Journal de Pharmacie de Belgique. 1995;50(6):484-488.

LORENZI H. Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP. 2008;4:672.

MAKHMUDOV RR, ABDULLADZHANOVA NG, KAMAEV FG. Phenolic compounds from *Plantago major* and *P. lanceolata*. Chemistry of Natural Compounds. 2011:1-2.

MAKSYUTINA NP. Baicalein and scutellarein derivatives in the leaves of *Plantago major*. Chemistry of Natural Compounds. 1971;7(3):352.

MAKSYUTINA NP. Hydroxycinnamic acids of *Plantago major* and *Pl. lanceolata*. Chemistry of Natural Compounds. 1971;7(6):795.

MCCUTCHEON AR, ELLIS SM, HANCOCK REW, TOWERS GHN. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. Journal of Ethnopharmacology. 1994;44(3):157-169.

MELLO JC, GUIMARÃES NSS, GONZALEZ MVD, PAIVA JS, PRIETO T, NASCIMENTO OR. Hydroxyl scavenging activity accounts for differential antioxidant protection of *Plantago major* against oxidative toxicity in isolated rat liver mitochondria. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012;64(8):1177-1187.

MELLO JPC, SANTOS SC, SIMÕES CMO, SCHENCKEL EP. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. UFSC: Porto Alegre. 2001:3.

MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, DOS SANTOS TC, COUBE CS, LEITÃO SG. Screnning of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001;15:127-130.

METINER K, ÖZKAN O, SEYYAL AK. 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.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL. Brine shrimp, a convenient general bioassy for active-plant constituents. Planta Medicinal. 1982;45:31-34

MEZZOMO N. Óleo de Amêndoa de Pêssego: Avaliação da Técnica de Extração, da Qualidade dos Extratos e de Parâmetros para Ampliação de Escala. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008:151.

MIDDLETON E JR, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC. Os efeitos de flavonóides de plantas em células de mamíferos: implicações para a inflamação, doenças cardíacas e câncer. Pharmacol Rev. 2000;52(4):673-751.

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.

MIRANDA ALP, FRAGA CAM. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. In: MONGE A, GANELLIN CR. Pratical Studies for Medicinal Chemistry. Genebra: IUPAC. 2006.

MIRZAEI A & MIRZAEI M. Comparison of the Artemia salina and Artemia uramiana bioassays for toxicity of 4 Iranian medicinal plants. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2013;2,(3):49-54.

MOLARES S & LADIO A. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a Mapuche community in NW Patagonia, Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 2009;123(3):397-406.

MOLLIK A, AKTER K, FARUQUE R, RAHMAN S, ISLAM T, AHMMED B, AZAM NK, FERDAUSI D, BHATTACHARYYA KN. Use of complementary and alternative medicine in patients with HAV/HBV/HCV infections: Results from a crosssectional study in the sherpur district of bangladesh. Journal of Immunotherapy. 2012;35(1):99-100.

MONDAL KC, BANERJEE D, JANA M, PATI BR, ANAL. Biochemical. 2001;295:168.

MONTEIRO JM, DE ALBUQUERQUE UP, DE LIMA ARAÚJO E, DE AMORIM ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Quimica Nova. 2005;28(5):892-896.

MORETTO E & FETT R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. Livraria Varela, São Paulo. 1998;1:150.

MUELLER-HARVEY I. Animal Feed Science and Technology 2001;91:3.

MUSCUIETTI LV & MARTINO VS. Atividades Biológicas dos Flavonóides Naturais. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Univale. 2007:1.

NACZK M & SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A. 2004:95.

NAMSA ND, TAG H, MANDAL M, KALITA P, DAS AK. An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit community of Arunachal Pradesh, India. Journal of Ethnopharmacology. 2009;125(2):234-245.

NEVES JM, MATOS C, MOUTINHO C, QUEIROZ G, GOMES LR. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). Journal of Ethnopharmacology. 2009;124(2):270-283.

NIKONOROVA AK, EGOROV CA, GALKINA TG, GRISHIN EV, BABAKOV AV. Antifungal activity of phenolic glicozide verbascoside from plantago major seeds. Mikologiya I Fitopatologiya. 2009;43(1):52-57.

NISHIBE S, TAMAYAMA Y, SASAHARA M, ANDARY C. A phenylethanoid glycoside from*Plantago asiatica*. Phytochemistry. 1995;38(3):741-743.

OGUNNUSI TA & DOSUMU OO. Bioactivity of crude extracts of Euphorbia kamerunica Pax using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. J. of Medicinal Plants Research. 2008;2(12):370-373.

OLENNIKOV DN, MIKHAILOVA TM, TANKHAEVA LM, SAMUELSEN AB. Organic acids of medicinal plants. *Plantago major*. Chemistry of Natural Compounds. 2005;41(4):467-468.

OLIVEIRA ER & 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.

OLIVEIRA FQ, GOBIRA B, GUIMARÃES C, BATISTA J, BARRETO M, SOUZA M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007:466-476.

OLIVEIRA HB, KFFURI CW, CASALI VWD. Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas em Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010;20(2):256-260.

OLIVEIRA VB, ZUCHETTO M, OLIVEIRA CF, PAULA CS, DUARTE AFS, MIGUEL MD, MIGUEL OG. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. Revista Brasil Plantas Medicinais. Campinas. 2016;18(1):230-239.

ORDOÑEZ AAL. Fitofármacos: medicina alternativa en comuna rural "El Manantial" (Argentina). Latin American Journal of Pharmacy. 2007;26(3):449-453.

OSOSKI AL, LOHR P, REIFF M, BALICK MJ, KRONENBERG F, FUGH-BERMAN A. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the

Dominican Republic used for women's health conditions. Journal of Ethnopharmacology. 2002;79(3):285-298.

OZTURK HS, SIMSEK E, OZER O. Antioxidant activities and total phenolic compound levels of various plants. FEBS Journal. 2012:279.

PANSERA MR, ATTI-SANTOS AC, SERAFINI LA, CASSEL E. Supercritical extraction of tannin with co-solvents. IV Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos em Salvador-Bahia. 2001:42.

PATEL SM, VENKATA KCN, BHATTACHARYYA P, SETHI G, BISHAYEE A. Potential of neem (Azadirachta indica L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. Seminars in Cancer Biology, Elsevier. 2016.

PEHLIVAN KARAKAŞ F, YILDIRIM A, TÜRKER A. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turkish Journal of Biology. 2012;36(6):641-652.

PEREIRA AS & STRINGHETA PC. Considerações sobre a cultura e processamento do açafrão. Horticultura Brasileira, Brasília. 1998;16(2):102-105.

PEREIRA CG, CUSTÓDIO L, RODRIGUES MJ, NENG NR, NOGUEIRA JMF, CARLIER J, COSTA JMC, VARELA J, BARREIRA L. Profiling of antioxidant potential and phytoconstituents of Plantago coronopus. Braz. J. Biol. 2017;77(3):632-641

PEREIRA FL, FERNANDES JM, LEITE JPV. Ethnopharmacological survey: A selection strategy to identify medicinal plants for a local phytotherapy program. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;48(2):299-313.

PETKEVICIUTE Z, SAVICKIENE N, SAVICKAS A, BERNATONIENE J, SIMAITIENE Z, KALVENIENE Z. Urban ethnobotany study in Samogitia region, Lithuania. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(1):064-071.

PIERONI A, DIBRA B, GRISHAJ G, GRISHAJ I, MAÇAI SG. Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe, Northern Albanian Alps. Fitoterapia. 2005;76(3-4):379-399.

PIERONI A. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. Journal of Ethnopharmacology. 2000;70(3):235-273.

PIEROZAN MK, PAULETTI GF, ROTA L, SANTOS ACA, LERIN LA, DI LUCCIO M, MOSSI AJ, ATTI-SERAFINI L, CANSIAN RL, VLADIMIR OLIVEIRA J. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de Sálvia L. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2009;29(4).

PINTO TJA, KANEKO TM, OHARA MT 2003. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 2003:325.

POBLETE A, LÓPEZ-ALARCÓN C, LISSI E, CAMPOS AM. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) values of herbal teas obtained employing

different methodologies can provide complementary data. Journal of the Chilean Chemical Society. 2009;54(2):154-157.

POLAT R & SATIL F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balikesir - Turkey). Journal of Ethnopharmacology. 2012;139(2):626-641.

POURMORAD F, HOSSEINIMEHR SJ, SHAHABIMAJD N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2006;5(11):1142-1145.

PURKAYASTHA J, NATH SC, ISLAM M. Ethnobotany of medicinal plants from Dibru-Saikhowa Biosphere Reserve of Northeast India. Fitoterapia. 2005;76(1):121-127.

RAMALHO VC & JORGE N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova. 2006:755-760.

RANDIC ZG & MALES Z. Spectrophotometric determination of acteoside in the herbal drugs Plantaginis lanceolatae folium and Plantaginis majoris folium. Farmaceutski Glasnik. 2008;64(5):239-243.

REHECHO S, URIARTE-PUEYO I, CALVO J, VIVAS LA, CALVO MI. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. Journal of Ethnopharmacology. 2011;133(1):75-85.

RODRIGUES ACC & GUEDES MLS. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas - Bahia. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2006;8(2):1-7.

RODRIGUEZ PARGAS A, LEON PADILLA MC, HERNANDEZ RODRIGUEZ A, JUNCO BARRANCO J. Actividad antifungica *in vitro* de una creama de plantago major. Revista Cubana de Plantas Medicinais. 1996;1(3):9-12.

ROGINSKY V & LISSI E. Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. Food Chemistry. 2005;92:235-254

ROIG JT & LLANTÉN. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica. 1988:1125.

ROMERO-BARANZINI AL, RODRIGUEZ OG, YANEZ-FARIAS GA, BARRON-HOYOS JM, RAYAS-DUARTE P. Chemical, Physicochemical, and Nutritional Evaluation of *Plantago* (*Plantago ovata* Forsk). Cereal Chem.2006;83(4):358-362.

RØNSTED N, GØBEL E, FRANZYK H, JENSEN SR, OLSEN CE. Chemotaxonomy of*Plantago.* Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry. 2000;55(4):337-348.

ROSSI CVS, ALVES PLCA, MARQUES JUNIOR J. Mobilidade do sulfentrazone em Latossolo Vermelho e em Chernossolo. Planta Daninha. 2005;23(4):701-710.

ROSSO SR. Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: Caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009:12-13.

RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, MORAIS SM, SAMPAIO CG, JIMENEZ JP, CALIXTO FDS. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.Comunicado Técnico Embrapa. 2007;127:1-4.

SAGANUWAN AS. Some medicinal plants of Arabian Pennisula. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(9):766-788.

SAHEBKAR A & EMAMI SA. Medicinal plants for the treatment of uterus inflammation: implications from Iranian folk medicine. Journal of Acupuncture and Meridian Studies. 2013;6(1):1.

SALTAN ÇG & ALTANLAR N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi. 2003;32(3):159-163.

SAMUELSEN AB, COHEN EH, PAULSEN BS, BRÜLL LP, THOMAS-OATES JE. Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, methylation and GC-MS, ESMS and ESMS/MS. Carbohydrate Research. 1999;315(3-4):312-318.

SAMUELSEN AB, LUND I, DJAHROMI JM, PAULSEN BS, WOLD JK, KNUTSEN SH. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. Carbohydrate Polymers. 1999;38(2):133-143.

SAMUELSEN AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology. 2000;71(1-2):1-21.

SANT'ANA, AE, ARAÚJO EL, MOURA NA, SAMPAIO ESB, GESTINARI LMS, CARNEIRO JMT. Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. Imprensa Universitária: UFRPE. Recife. 2002.

SANTOS JFL & AMOROZO MCM, MING LC. Uso popular de plantas medicinais na comunidade rural da Vargem Grande, Município de Natividade da Serra, SP. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2008;10(3):67-81.

SANZ MJ, FERRANDIZ ML, CEJUDO M, TERENCIO MC, GIL B, BUSTOS G, UBEDA A, GUNASEGARAN R, ALCARAZ MJ. Influence of a series of natural flavonoids on free-Radical generating Products Research - Past, Present and Future, Amsterdam, The Netherlands. 1999.

SANZ-BISET J, CAMPOS-DE-LA-CRUZ J, EPIQUIÉN-RIVERA MA, CAÑIGUERAL S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology. 2009;122(2):333-362.

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.

SCHOFIELD P, PELL NA, MBUGUA DM. Animal Feed Science and Technology. 2001;91:21.

SEZIK E, YEŞILADA 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.

SHARIFA AA, JAMALUDIN J, KIONG LS, CHIA LA, OSMAN K. Anti-urolithiatic terpenoid compound from *Plantago major* Linn. (Ekor Anjing). Sains Malaysiana. 2012;41(1):33-39.

SHI J., MAZZA G., MAGUER M. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Boca Raton. FL: CRC Press. 2002.

SILVA CTA, PELINSON AP, CAMPELO AM. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na região urbana no município de Quedas do Iguaçu-Paraná. Cultivando o Saber. Cascavel. 2010;2(1):14-25.

SILVA MGF**.** Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (Origanum majorana L.) e manjericão (Ocimum basilicum L.). Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2011.

SILVESTRI JDF, PAROUL N, CZYEWSKI E, LERIN L, ROTAVA I, CANSIAN RL, MOSSI A, TONIAZZO G, DE OLIVEIRA D, TREICHEL H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (Eugenia caryophyllata Thunb.). Revista Ceres. 2010;57(5):589-594.

SIMÕES CM & SPITZER V. Óleos voláteis. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC. 2004.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G. MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC. 2010;6:1104.

SINGLETON VL, ORTHOF R, LAMUELA-RAVENTÓS RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Journals & Books. 1999;299:152-178.

SINGLETON VL & ROSSI JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 1965;16:144-158.

SOARES SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revista de Nutrição. 2002;15(1):71-81.

SOURI E, AMIN G, FARSAM H, BARAZANDEH TM. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. Daru. 2008;16:83-87.

SPAGOLLA LC et al. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009;30:187-191.

SPRING MA. Ethnopharmacologic analysis of medicinal plants used by laotian hmong refugees in Minnesota. Journal of Ethnopharmacology. 1989;26(1):65-91.

STEF DS, IOSIF G, IOAN-TRASCA T, STEF L, POP C, HARMANESCU M. Evaluation of 33 medicinal plant extracts for the antioxidant capacity and total phenols. Journal of Food, Agriculture and Environment. 2010;8(3-4):207-210.

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.

SUZUKI N & MASHU S. Field work on traditional folk medicine for pain relief in Mongolian pastoral areas. Journal of Japanese Dental Society of Anesthesiology. 2010;38(5):575-579.

TARVAINEN M, SUOMELA JP, KALLIO H, YANG B. Triterpene acids in plantago major: Identification, quantification and comparison of different extraction methods. Chromatographia. 2010;71(3-4):279-284.

TASKOVA R, HANDJIEVA N, EVSTATIEVA L, POPOV S. Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. Phytochemistry. 1999;52(8):1443-1445.

TIWARI P. Phytochemical screening and Extraction: a review. Internationale Pharmaceutica Sciencia. 2011;1(1):98-106.

TOMÁS-BARBERÁN FA, GRAYER-BARKMEIJER RJ, GIL MI, HARBORNE JB. Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the labiatae, the scrophulariaceae and related families. Phytochemistry. 1988;27(8):2631-2645.

TORRI MC. Perceptions and uses of plants for reproductive health among traditional midwives in Ecuador: Moving towards intercultural pharmacological practices. Midwifery. 2013;29(7):809-817.

TOVAR RT & PETZEL RM. Herbal toxicity. Disease-a-month. 2009;55(10):592–641.

TOYODA M, TANAKA K, HOSHINO K, AKIYAMA H, TANIMURA A, SAITO Y. Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997;45(7):2561-2564.

TRUGILHO PF, CAIXETA RP, LIMA JT, MENDES LM. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. Cerne, Lavras. 1997;3(1):1-13.

TUTIN TG, HEYWOOD VH, BURGES NA, VALENTINE DH, WALTERS SM, WEBB DA. Flora Europaea. Cambridge: Cambridge University Press. 1976;39.

TUZLAC E & AYMAZ PE. Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balikesir). Fitoterapia. 2001;72(4):323-343.

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. 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.

VASCONCELOS J, JANAINA, VIEIRA JGP, VIEIRA EPP. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. Revista Científica da UFPA. 2009;7(1):1-10.

VÁSQUEZ J, JIMÉNEZ SL, GÓMEZ IC, REY JP, HENAO AM, MARÍN DM. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia-The traditional use of plants. Journal of Ethnopharmacology. 2013.

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

VELLOSO CC & SOARES MA. "Levantamento Etnobotânico de Plantas com Potencial Medicinal na Floresta Nacional de Canela/RS": nossas plantas nossa vida. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR. 2007:51.

VICENTINO ARR & MENEZES FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2007;17(3):384-387.

VIGNOLI LL, SANTOS LCO, GARCIA RO, PASCHOAL RC, ZACHI ARL, BARROS ALF, MEJA CF. Theoretical and Simulational Aspects of Single Bubble Sonoluminescence. In: Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. Águas de Lindóia, Anais. São Paulo. 2012.

VITALINI S, TOMÈ F, FICO G. Traditional uses of medicinal plants in Valvestino (Italy). Journal of Ethnopharmacology. 2009;121(1):106-116.

WENNERSTEN R, YDBERG J, MUSIKAS C, CHOPPIN GR. Extraction of organic compounds. Principles and practices of solvent extraction. New York. Marcel Dekker. 1992;9:115-356.

WILLIANS CA & GRAYER RJ. Anthocyanins and other flavonoids. Natural products Reports. 2004;21:539-573.

WU CY, RAVEN PH, HONG DY. Flora of China (Curcurbitaceae through Valerianaceae with Annonaceae and Berberidaceae). Flora of China. Beijing & St. Louis: Science Press & Missouri Botanical Garden Press. 2011:1-884.

YANLING W, YUGE N, XIN Z, BANGQUAN W, QIANQIAN J, JIE L, YI SHENG. Fatty Acid and Phytochemical Compositions of *Plantago* Seed Oils and Their Functionalities. J Am Oil Chem Soc. 2017;94:905–912

YILMAZ Y & TOLEDO RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. Journal of Food Composition and Analysis. 2006;19:41–44.

YOUNOS C, FLEURENTIN J, NOTTER D, MAZARS G, MORTIER F, PELT J-M. Repertory of drugs and medicinal plants used in traditional medicine of Afghanistan. Journal of Ethnopharmacology. 1987;20(3):245-290.

YUTING C, RONGLIANG Z, ZHONGJIAN J, YONG J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants.*Free Rad. Biol. Med.* 1990;9:19-21.

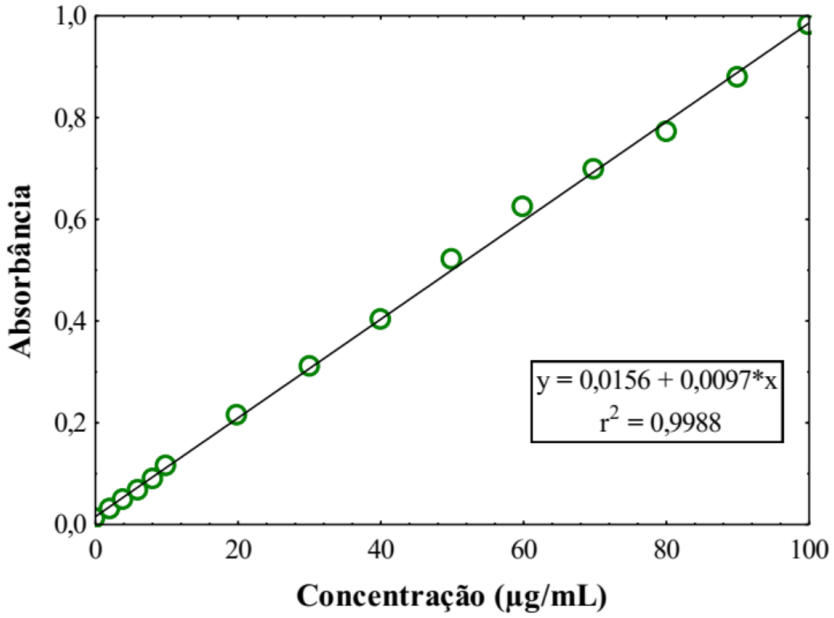
ZACCHIGNA M, CATENI F, FAUDALE M, SOSA S, LOGGIA RD. Rapid HPLC analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, oleanolic acid and ursolic acid, in plantago major. Scientia Pharmaceutica. 2009;77(1):79-86.

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. 2012;136:9-16.

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(4):523-529.

APÊNDICE I

Figura 5. Curva padrão de ácido gálico para determinação de fenóis totais.

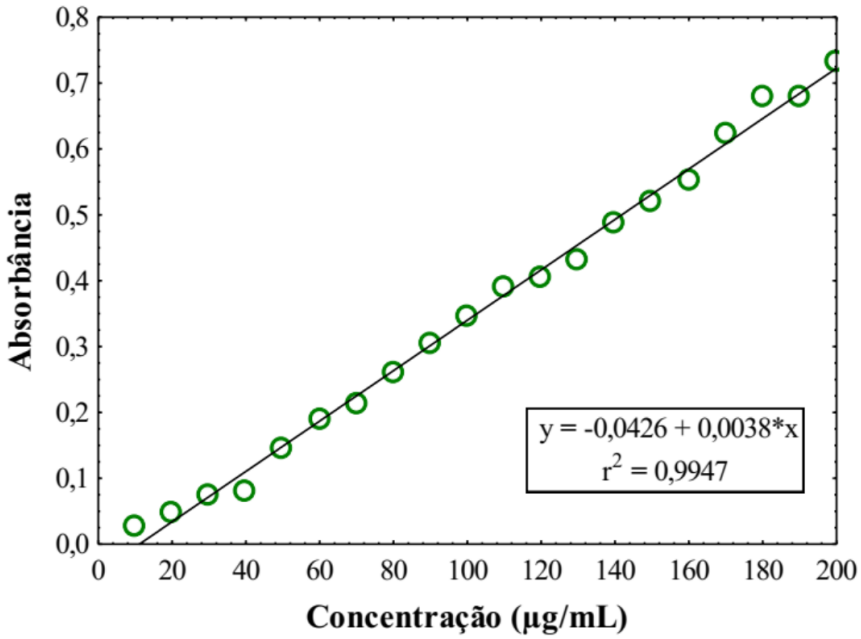


$$Compostos\ Fenólicos\ \left(\frac{mgEAG}{g}\right) = \frac{(Abs_A - Abs_B - 0{,}0156) * Df}{C_{inicial} * 0{,}0097}$$

Onde, Abs_A é a leitura de absorbância da amostra, Abs_b é a leitura de absorbância do branco, *Df* é o fator de diluição, e $C_{inicial}$ é a concentração inicial do extrato utilizado para a realização da análise, em mg/mL.

APÊNDICE II

Figura 6. Curva padrão de quercetina para determinação de flavonoides totais.

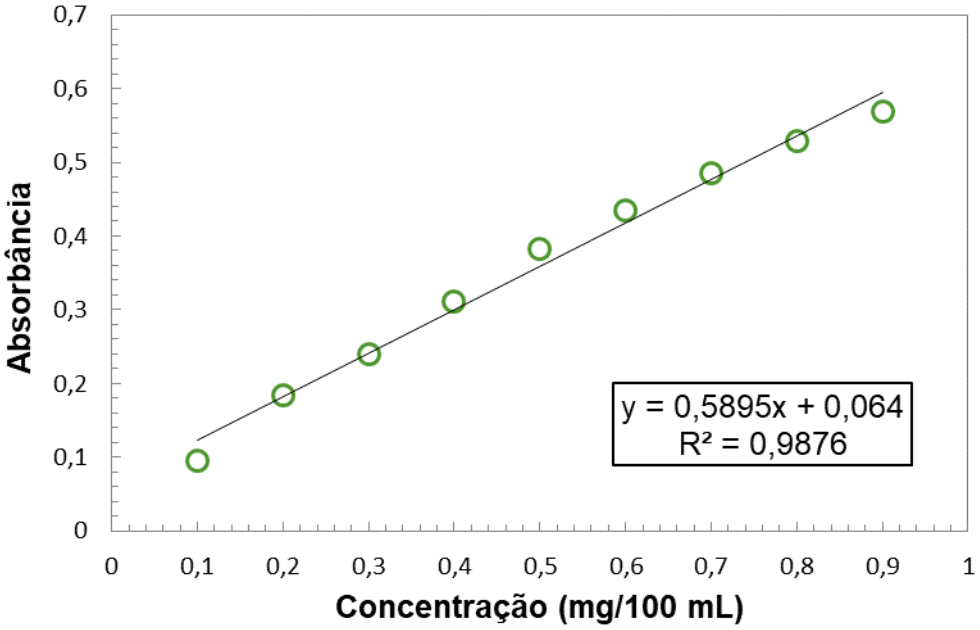


$$Flavonóides\ \left(\frac{mgEQ}{g}\right) = \frac{(Abs_A - Abs_B - 0{,}0426) * Df}{C_{inicial} * 0{,}0038}$$

Onde, Abs_A é a leitura de absorbância da amostra, Abs_b é a leitura de absorbância do branco, *Df* é o fator de diluição, e $C_{inicial}$ é a concentração inicial do extrato utilizado para a realização da análise, em mg/mL

APÊNDICE III

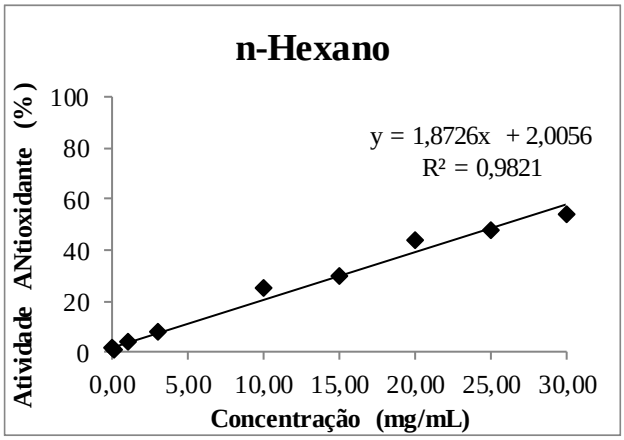
Figura 7. Curva padrão para determinação de taninos.

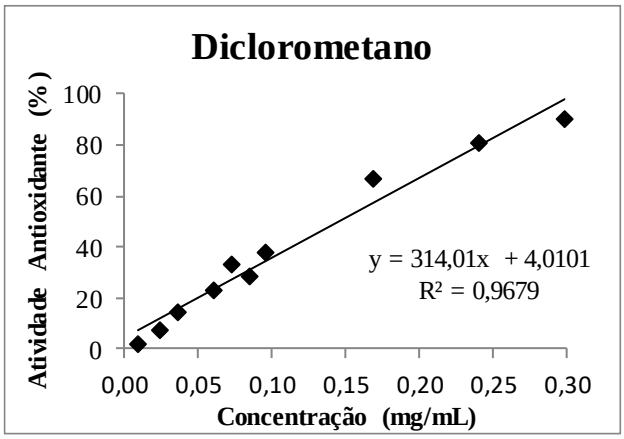


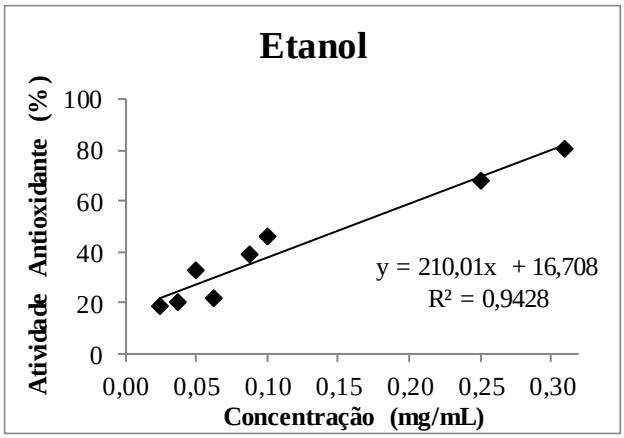
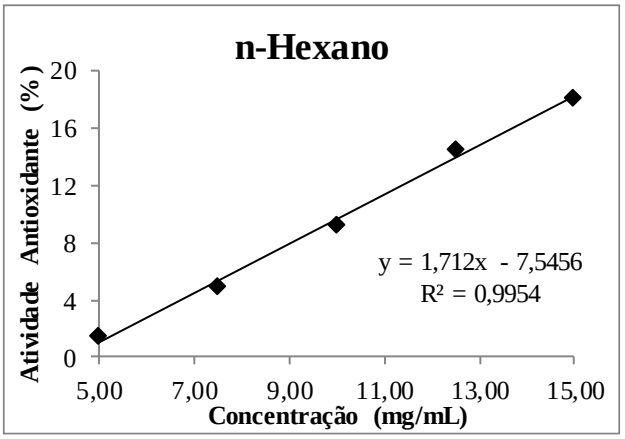
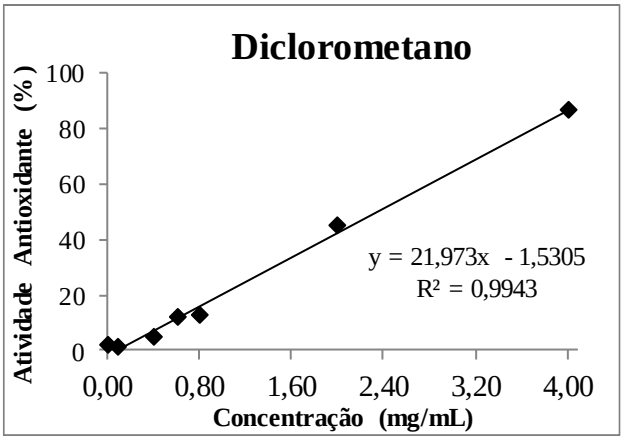
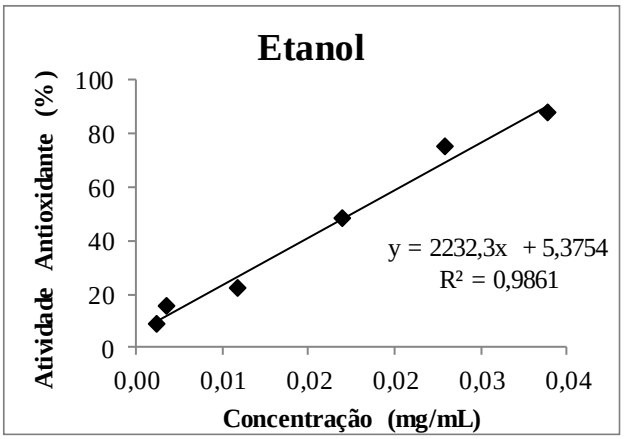
APÊNDICE IV

Figura 8. Curvas de atividade antioxidante para extratos de sementes (a) *P. tomentosa* e (b) *P. major*.

(a)







(b)