

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE *PLANTAGO OVATA* EM DIFERENTES CULTIVARES NO ESTADO DA BAHIA

Vitor H. Miguez¹, Juceni P. L. David²

¹ Departamento de Ciências e Tecnologias I, R. Silveira Martins, 2555 - Cabula, Salvador - BA, 41150-000. vhmiguez@gmail.com

² Faculdade de Farmácia, UFBA, Rua Barão de Jeremoabo, 147 - Ondina, Salvador - BA, 40170-115

Palavras-Chave: CLAE, Quimiometria, UV-VIS

Introdução

A *Plantago ovata*, também conhecida como *psilium*, é uma planta da família Plantaginaceae, amplamente reconhecida por suas sementes e cascas ricas em fibras solúveis. Essa planta tem sido utilizada tradicionalmente em diversas culturas devido às suas propriedades terapêuticas, principalmente como agente laxativo e regulador intestinal. O *psilium*, também tem ganhado destaque em estudos científicos recentes por seu papel no controle dos níveis de colesterol e glicose no sangue, sendo cada vez mais empregado em formulações farmacêuticas e nutracêuticas (MEHTA et al., 2017).

Contudo, para que o *psilium*, seja eficaz e seguro para o consumo humano, é essencial garantir um controle de qualidade rigoroso em todas as etapas de sua produção, desde o cultivo até o processamento final. A complexidade da cadeia produtiva do *Plantago ovata* e o crescente interesse na sua comercialização em larga escala exigem a implementação de normas de qualidade que assegurem a pureza, potência e segurança do produto (SINGH et al., 2018).

A família Plantaginaceae tem sido alvo de diversos estudos norteados pela relação entre a composição fitoquímica de suas espécies e atividades farmacológicas, sejam elas *in vitro* ou *in vivo*. No gênero *Plantago*, mais especificamente, os extratos *n*-hexano e etil-acetato de *P. asiatica* L. foram testados quanto à sua atividade antioxidante pelo método de capacidade de absorvância de radicais oxigenados. Os resultados demonstraram que a forma etil-acetato do extrato exerceu notável capacidade sequestrante de radicais livres (AMAKURA et al., 2012).

Grande problema que concerne as plantas medicinais é a biopirataria. Conforme Galdino (2012) não existe uma definição clara para a biopirataria, mas o termo está associado a empresas e instituições de pesquisas que exploram ilegalmente plantas e animais e os conhecimentos de comunidades tradicionais.

Adicionalmente, os medicamentos fitoterápicos apresentam diferenças importantes quando comparados com os sintéticos. A primeira, é que ao contrário dos medicamentos sintéticos, os princípios ativos dos fitoterápicos raramente são conhecidos. Outra diferença fundamental é que o controle de qualidade e a padronização dos fitoterápicos são tarefas bem mais complexas do que no caso dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2001).

Quando a análise morfológica não é possível de ser realizada ou impossibilita a identificação das espécies vegetais, pode-se utilizar marcadores moleculares característicos (fingerprints) para este objetivo. O estabelecimento de um fingerprint característico, geralmente cromatográfico, e sua utilização para identificação de uma espécie ou variedade vegetal é consistente, independente do tecido e da idade da planta (SHAW; BUT, 1995).

Assim, a análise química através do fingerprint constitui uma maneira racional e estratégica para assegurar a autenticidade, consistente qualidade e estabilidade das plantas medicinais e suas preparações.

Pesquisas científicas têm apontado a presença de diversas irregularidades que comprometem a eficácia e colocam em risco a saúde do consumidor. Uma das causas para esse panorama tem sido o fato de as indústrias responsáveis pela fabricação desses produtos serem basicamente constituídas por empresas de pequeno porte que funcionam precariamente (ZUCCOLOTTO *et al.*, 1999). Veiga-Junior e Pinto (2005) enfatizam que as pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são escassas, comprometendo a fiscalização do comércio por parte dos órgãos competentes.

Visto que a má qualidade de um produto pode interferir na ação farmacológica preconizada para a espécie, potencializando efeitos indesejáveis, e que muitas plantas medicinais nativas sofrem ameaças que podem levá-las à extinção, pesquisas avaliando a qualidade de produtos a base de plantas medicinais e estabelecendo prioridades de conservação para espécies vegetais medicinais são essenciais.

Diante dos muitos problemas encontrados neste tipo de matéria-prima vegetal tais como excesso de umidade, presença de contaminantes entre outros, é necessário um controle de qualidade dos mesmos, para assegurar o consumo seguro desses produtos. Assim concretiza-se o desenvolvimento de um método de controle de qualidade químico

Material e Métodos

Material botânico

Para a realização deste trabalho foram selecionadas dez cidades onde ocorre a venda de plantas medicinais e maior frequência de consumidores, localizados em pontos distintos do estado da Bahia.

Padrões Químicos

Os solventes e os padrões para HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi produzida por um sistema de purificação de água UV Sartorius Arium® 611 (Göttingen, Alemanha). Os padrões de referência de plantago utilizados foram: L-arabinose, D-xilose, ranmose, ácido ursólico, ácido oleanólico e aucubina certificados internacionalmente pela USP (United States Pharmacopeia) e FDA (Food and Drug Administration).

Nesse experimento, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo de sistema Dionex UltiMate 3000 - sistema de HPLC com amostrador automático, detector de DAD gerenciado por um software Chromeleon®. Os cromatogramas foram obtidos usando a coluna de HPLC analítica COLUNA HPLC NUCLEODUR C18 5µm 150x4,6mm.

Para avaliação de *P. ovata* a fase móvel consistiu numa mistura (v/v) de Metanol (componente A) e água/MeCN pH 2,5 ajustado com TFA 0,1% (componente B), em modo gradiente, a uma taxa de fluxo de 0,5 ml.min⁻¹, por 80 minutos, temperatura do forno a 30 °C, volume de injeção de 10 µL.

Os espectros foram salvos no formato Comma Delimited (CSV) e exportados para o software OriginPro® 8. Na sequência os espectros foram exportados para o Matlab® 6.1. Para análise dos dados, foram utilizadas as médias das absorbâncias obtidas para cada solução (UV-Vis) e a área do Pico (HPLC), no comprimento de onda de cada padrão. Os dados foram tratados no software Microsoft Office Excel® 2016, construída a curva de concentração e determinação da equação da reta.

Preparo das amostras

As amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 48 horas. Logo após, foram fragmentadas em moinho de facas. Cerca de 100 gramas do material vegetal foi submetido ao processo de maceração, utilizando mistura binária de álcool/água 70% como solvente extrator. Os extratos permaneceram em maceração por sete dias, com agitação diária. Finalizando o período de extração, foram filtrados através de gaze e papel filtro e concentrados em rotaevapor (Laborota 4000 eco) para redução de volume (MATOS, 1997). Os extratos foram transferidos para recipientes limpos e identificados.

Os extratos de cada planta foram pesados com precisão e redissolvidos em solução EtOH-H₂O (3:7) à concentração final de 10 mg/ml e submetidos a sonicação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as soluções das amostras foram filtradas através de membrana Millipore de 0,45 e 0,22 µm antes da injeção.

Preparo dos marcadores químicos

As amostras dos marcadores químicos foram preparadas a partir de aproximadamente 10 mg de cada padrão e diluídos com água em balão volumétrico de 10,00 mL. Em seguida, colocou-se em ultrassom até a total solubilização da amostra. Alíquotas de 1,00 mL foram retiradas e avolumadas para 10,00 mL com água e homogeneizado, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹.

Validação

O método foi validado de acordo com as diretrizes contidas na Resolução-RE n 899, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2003). As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote de software Statistica. Um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

Resultados e Discussão

O cromatograma da Figura 1, mostra a separação de todos os compostos padrões em tempo de análise menor que 60 min.

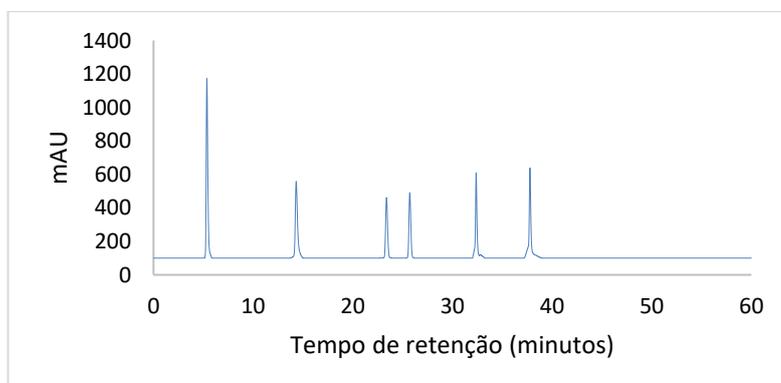


Figura 1: Espectro dos padrões combinados de padrões de *P. ovata*: Aucubina, ramnose, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido galacturônico e arabinose, respectivamente.

Os fatores de retenção demonstraram que os picos dos fármacos estão resolvidos, devido à adequada força de eluição da fase móvel. O valor de resolução calculado foi acima de 2,0, o que mostra a total separação entre os picos. Os valores de fator de cauda, próximos da unidade,

são ideais, pois indicam a simetria dos picos. Picos simétricos minimizam erros na quantificação dos fármacos (SILVA *et al.*, 2006). A eficiência de uma coluna aumenta com o número de pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado em relação aos seis marcadores.

A adição de marcadores na amostra de *P. ovata* foi realizada para corroborar a presença dos picos e o tempo de eluição de cada marcador. A Figura 2 apresenta a comparação entre a análise da amostra certificada (identificada) de *P. ovata* com o cromatograma em que houve adição dos padrões

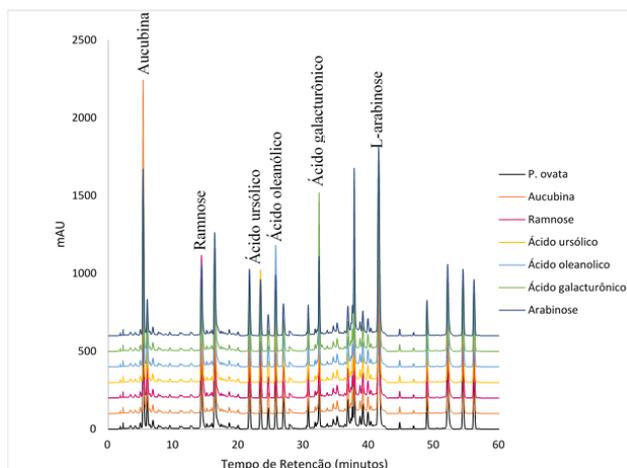


Figura 2: Cromatograma de *Plantago ovata* juntamente com a adição dos marcadores químicos padrões.

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica elaborada na concentração de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ pois esta foi a menor concentração possível para se determinar a integração da área do pico. Com os dados obtidos da equação da reta, calcularam-se o LD e o LQ, representados na Tabela 1.

Tabela 1: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para marcadores químicos de *P. ovata*.

Padrão	S_m/R_m	LD	LQ
Aucubina	0,7407	0,81	2,70
Ramnose	0,3352	1,79	5,97
Ácido ursólico	2,4000	0,25	0,83
Ácido oleanólico	1,8750	0,32	1,07
Ácido galacturônico	1,3333	0,45	1,50
Arabinose	0,7143	0,84	2,80

Os LD variaram entre $0,25$ e $1,79 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor de LD mais baixo foi obtido para o Ramnose ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$). O valor de LQ mais alto foi obtido para Ramnose, com valor igual a $5,97 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas analíticas obtidas para os marcadores químicos utilizados para a espécie *P. ovata* foi construída, numa faixa compreendida entre $0,2$ - $100 \mu\text{g/mL}$ e os dados referentes às médias das triplicatas das curvas padrão estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 2: Dados obtidos das curvas padrão para os marcadores químicos utilizados em *P. ovata*. Os valores referem-se a média da análise em triplicata.

Concentração (µg/mL)	Aucubina	Ramnose	Ácido ursólico	Ácido oleanólico	Ácido galacturônico	Arabinose
0,2	21649	3388	2734	2651	3842	2556
2	154891	39546	33902	32873	47654	31697
10	618338	155764	133536	159481	187701	114851
25	1690916	350714	366678	355544	515411	319829
50	2865483	646855	755971	699394	767432	600463
100	5450755	1308202	1556103	1487462	1576429	1248574

Os dados obtidos das curvas de calibração estão na Tabela 3.

Tabela 3: Coeficiente angular, coeficiente linear e correlação obtidos através da regressão de mínimos quadrados para as curvas padrão dos marcadores químicos de *P. ovata*.

Padrão	m	b	r ²
Aucubina	113381	218935	0,9968
Ramnose	29694	58734	0,9967
Ácido ursólico	30424	18168	0,9994
Ácido oleanólico	30192	30707	0,9979
Ácido galacturônico	31347	69281	0,9933
Arabinose	20617	44179	0,9950

Observa-se pela Tabela 4 que o coeficiente de correlação de todos os marcadores utilizados foi próximo a 1,0. Dessa forma, observa-se alta correlação entre a concentração e o pico determinado por CLAE, uma vez que o intervalo estudado se mostrou linear sob a investigação do gráfico de resíduos

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para as análises de *P. ovata* comercializados em feiras livres do estado da Bahia.

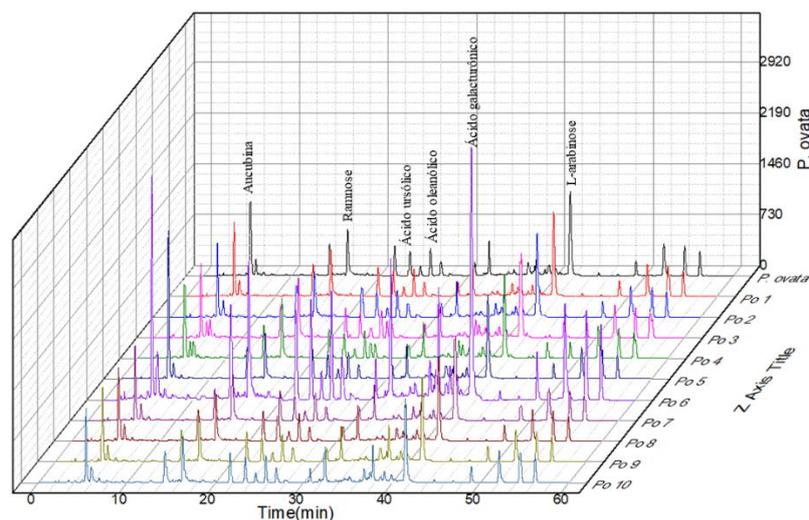


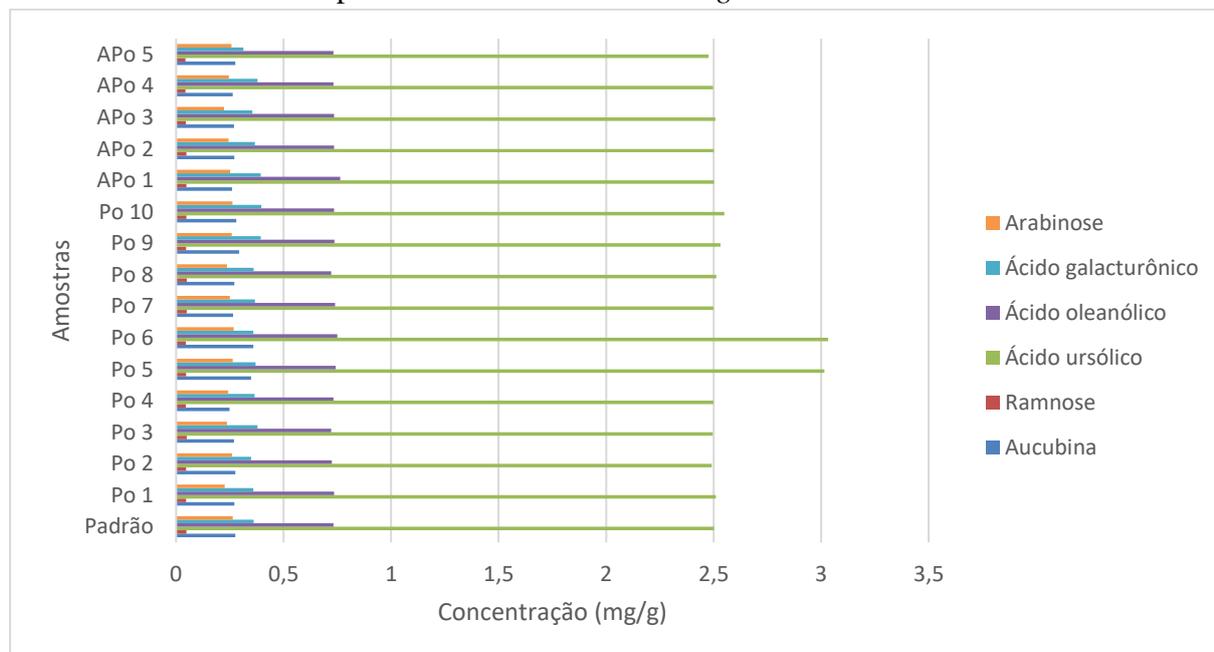
Figura 3: Cromatograma das amostras de *P. ovata* coletadas no estado da Bahia. Em preto, amostra identificada (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso.

A partir da análise da Figura 3, observa-se que há alta correlação entre os cromatogramas analisados. A análise visual revela que os cromatogramas apresentam-se conservados. Todavia, é perceptível que as amostras Po 3 e Po4 apresentam picos diferentes quando comparados ao padrão. De acordo com ANVISA (2014), as espécies *Plantago psyllium* e *Plantago indica* (*Plantago arenaria*), sementes de outras espécies de *Plantago* podem ser detectadas, como *P. major* L. e *P. media* L., o que foi corroborado por Shahat et al. (2012) e Bisset e Wichtl (2011).

Outra discrepância encontrada na Figura 3 diz respeito as amostras Po 5 e Po 6. Tais amostras apresentam concentrações e áreas dos compostos aucubina na amostra Po 5, aucubina, ácido ursólico e oleanólico na amostra Po 6.

Os cromatogramas obtidos na Figura 3 foram utilizados para a determinação da concentração dos marcadores químicos utilizados (Tabela 4). As amostras foram analisadas com um rigor de qualidade, conforme boas práticas de laboratório e seguindo as recomendações de coleta e armazenamento das amostras, citadas anteriormente (STANDARD METHODS, 1997).

Figura 4: Concentração, em mg/g, dos marcadores químicos presentes em amostras de *P. ovata* coletadas no estado da Bahia. Po (padrão), 1- Salvador, 2 – Ilhéus, 3 – Porto Seguro, 4 – Jequié, 5 – Guanambi, 6 – Barreiras, 7 – Irecê, 8 – Euclides da Cunha, 9 – Juazeiro, 10 – Paulo Afonso, e das amostras de fitoterápicos analisados. Po = *Plantago ovata*



Observa-se que a concentração dos metabólitos se mostrou praticamente sem diferenças significativas entre as amostras analisadas, todavia, algumas amostras apresentaram concentração mais elevada comparada a amostra padrão. As amostras dos fitoterápicos analisadas, mostram-se correlatas com o padrão.

Tamura e Nishibe (2002) avaliaram a quantidade de ácido ursólico e ácido oleanólico de *Plantago* da Nova Zelândia e verificaram que a quantidade desses metabólitos variavam de

acordo com a sazonalidade da colheita. Ademais, corroboraram que o bioma exerce forte impacto na concentração dos metabólicos com variação de 2,5 – 9,8 %.

No dendrograma HCA, a menor distância entre duas amostras indicou sua maior similaridade e as amostras agrupadas no mesmo grupo foram as mais similares. O grupo 1 composto pelas amostras: padrão, Po 1, Po2, Po 3., Po 4, Po 7 e Po 8, com maior similaridade foram classificados em um aglomerado, da mesma forma que o grupo G2, composto por Po 9 e Po 10. As outras amostras, Po 5 e Po 6, formaram grupos a parte: grupo 3. Dessa forma, podemos inferir que os resultados de agrupamento poderiam ser causados pelas diferenças de origem vegetal, efeito do ambiente, estação de coleta, condições de armazenamento, etc. das amostras.

As variáveis responsáveis pela separação das análises na PC1 são aucubina, ácido ursólico, ácido oleanólico e arabinose que apresentam valores positivos. Através da componente principal 2, é possível separar os analitos ácido oleanólico, ácido galacturônico, ramnose e arabinose dos demais. Confrontando as informações do gráfico de pesos e de escores, notase a formação de três grandes grupos. Um primeiro grupo deslocado à esquerda, composto pela amostra amostras: padrão, Po 1, Po2, Po 3., Po 4, Po 7 e Po 8, um segundo grupo, central acima, composto pelas amostras Po 9 e Po 10 e um terceiro grupo, à direita, formado pelas amostras Po 5 e Po 6.

Os resultados do Teste *t* de Student, presumindo variâncias equivalentes e $p < 0,05$, demonstraram não haver diferença significativa entre a metodologia proposta em comparação a metodologia por espectrofotometria UV-Vis. O coeficiente de correlação (P-valor) de 0,33885 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação. De fato, o valor de F calculado (0,029468) é menor que o valor de F crítico (3,890867). A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos demonstrou que não haver diferenças significativas entre as metodologias ($p = 0,05$).

A análise da PCA para avaliação das duas metodologias evidenciam que não há diferenças entre as metodologias, uma vez que amostras semelhantes se agruparam juntamente. Dessa forma, pode-se verificar que a metodologia proposta é de grande valia para a determinação dos marcadores químicos em *P. ovata*, bem como avaliar a qualidade das amostras.

Conclusões

Os resultados do estudo geográfico demonstraram que existe uma variação quali e quantitativa significativa nas classes de metabólitos secundários investigadas. Tais resultados são evidenciados pela diferença de biomas bem como da época de colheita das espécies vegetais. Dessa forma, esse tipo de análise é de suma importância, uma vez que os espécimes estudados estão na lista de plantas medicinais oferecidas pelo SUS e, dessa forma, diferenças nas concentrações dos metabólicos ocasionam alterações na terapia.

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-VIS das amostras de plantas medicinais e fitoterápicos, foi possível observar que com apenas 4 componentes principais foi plausível agrupar amostras com base nas características de variedade e/ou região de produção. Também foi possível identificar através dos *loadings* os comprimentos de onda responsáveis por esse agrupamento bem como os metabólitos responsáveis por tais agrupamentos.

Através da análise do coeficiente de correlação, do R-quadrado e do coeficiente angular verificou-se que os modelos construídos foram eficientes para realizar as predições das concentrações a partir dos espectros de absorção e cromatogramas, principalmente para as

amostras que apresentaram semelhanças identificadas na PCA com aquelas utilizadas na construção dos modelos.

As dificuldades encontradas na predição do teor dos marcadores químicos em algumas das amostras analisadas se devem pelas diferenças observadas entre essas amostras e as matrizes empregadas na construção dos modelos de calibração, o que representa a principal limitação do método. Entretanto, essas dificuldades podem ser resolvidas pela construção dos modelos de calibração com base nas semelhanças observadas pelos grupos de amostras na PCA.

Agradecimentos

Os Autores agradecem à UFBA pelo Apoio Financeiro e equipamentos e à CAPES pela bolsa concedida.

Referências

- AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, A.; YOSHIMURA, M.; YOSHIDA, T. Isolation and characterization of phenolic antioxidants from *Plantago* herb. *Molecules*. 2012;17(5):5459-66.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Lippes WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Regulamento que estabelece guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União, 02 de fevereiro de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm
- BISSET, N. G.; WICHTL, M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. 2º ed. Boca Raton: CRC Press; 2011.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2) 179-189, 2001.
- GALDINO, V. S. Das plantas medicinais e a biopirataria. Disponível em: http://www.publicadireito.com.br/conpedi/manaus/arquivos/anais/manaus/direito_ambiental_valeria_silva_galdi_no.pdf.
- MEHTA, R.; KUMAR, V.; REDDY, A. *Plantago ovata*: Phytochemical and pharmacological properties. *Pharmacognosy Reviews*, 11(22), 159-164, 2017
- SHAHAT, A. A.; IBRAHIM, A. Y.; ELSAID, M.S. Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Some Wild Asteraceae Plants *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7: 554-551, 2014.
- SHAW, P. C.; BUT, P. P. H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. *Planta Medica*, v. 61, p. 466-469, 1995.
- SILVA-CORAZZA, P. E. R.; LOPES, G. C.; DICIAULA, M. C.; LIMA, M. M. S.; MELLO, J. C. P. de. Pharmaceutical topical gel: development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of polyphenols. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.29, n.5, p.1-5, 2006.
- SINGH, M.; KUMAR, S.; GUPTA, P. A comprehensive review on *Plantago ovata* (Psyllium). *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(23), 367-375, 2018.
- TAMURA, Y.; NISHIBE, S. Changes in the Concentrations of Bioactive Compounds in Plantain Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2514-2518, 2002.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova*, 28(3): 519-528, 2005.
- ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M.; RATES, S. M. K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 58(2): 25-31, 1999.