

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA
VEGETAL E DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE *Ziziphus joazeiro*
Mart. (Juazeiro)

GEOVANA QUIXABEIRA LEITE

JOÃO PESSOA – PB

2023

GEOVANA QUIXABEIRA LEITE

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA
VEGETAL E DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE *Ziziphus joazeiro*
Mart. (Juazeiro)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos para obtenção do título
de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. RUI OLIVEIRA MACÊDO

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L533d Leite, Geovana Quixabeira.

Desenvolvimento tecnológico e caracterização da
droga vegetal e dos extratos vegetais obtidos de
Ziziphus joazeiro Mart. (Juazeiro) / Geovana Quixabeira
Leite. - João Pessoa, 2023.
132 f.

Orientação: Rui Oliveira Macêdo.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Plantas medicinais. 2. Metabólitos secundário. 3.
Validação analítica. 4. Método colorimétrico. I.
Macêdo, Rui Oliveira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 633.88(043)



PgPNBSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 353ª (trecentésima quinquagésima terceira) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Geovana Quixabeira Leite**, candidata ao Título de “Doutora” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia nove de fevereiro do ano dois mil e vinte e três (09/02/2023), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/emn-hxhw-pbh>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Geovana Quixabeira Leite**, candidata ao Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Fernando Henrique Andrade Nogueira, Ph.D em Ciências Farmacêuticas, Alecksandra Vieira Lacerda, Ph.D em Ecologia e Recursos Naturais, João Augusto Oshiro Junior, Ph.D em Ciências Farmacêuticas, Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Ph.D em Química Orgânica e Rui Oliveira Macêdo, Ph.D em Química Analítica. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Campina Grande; o terceiro, integrante do corpo docente do Centro Universitário Facisa; e os demais, integrantes do corpo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Rui Oliveira Macêdo, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Geovana Quixabeira Leite**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Desenvolvimento tecnológico e caracterização da droga vegetal e dos extratos vegetais obtidos de *Ziziphus joazeiro* (Juazeiro)”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se a examinada **Geovana Quixabeira Leite**, legalmente habilitada a receber o Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Documento assinado digitalmente



RUI OLIVEIRA MACEDO
Data: 24/02/2023 09:36:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo (Orientador)

Documento assinado digitalmente



FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA
Data: 13/02/2023 17:07:08-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira (Examinador)

Documento assinado digitalmente



ALECKSANDRA VIEIRA DE LACERDA
Data: 15/02/2023 14:29:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª. Drª. Alecksandra Vieira Lacerda (Examinadora)





PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos



Documento assinado digitalmente
JOAO AUGUSTO OSHIRO JUNIOR
Data: 15/02/2023 09:26:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior (Examinador)



Documento assinado digitalmente
MARIA DE FATIMA VANDERLEI DE SOUZA
Data: 20/02/2023 16:46:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza (Examinadora)



Documento assinado digitalmente
GEOVANA QUIXABEIRA LEITE
Data: 13/02/2023 08:47:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Geovana Quixabeira Leite (Discente)



“Sobre a pressão que as pessoas descarregam sobre mim, é dor comunicada. Quem aprendeu pela via da submissão, da força, não tem repertório pra uma postura mais humana, compreensiva e acolhedora. É tristíssimo de assistir. É dolorido de suportar, mas por isso é importante falar sobre. Humanização passa necessariamente por escuta e acolhimento”.

Gabriela Prioli

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por serem a personificação do cuidado e amor de Deus em minha vida.
Por acreditarem e investirem no projeto educação incansavelmente. A minha história
não seria a mesma sem essa rede de apoio, incentivo e amor.

Ao meu amado irmão por ser a referência do amor, cuidado, carinho, compreensão. Eu
escolherei você como irmão em todas as outras vidas que virão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me carregou no colo em todos os dias que pensei não suportar.

À minha mãe, meu pai e irmão por acreditarem em meu sonho e permitir torná-lo realidade.

Ao meu orientador, professor Rui Oliveira Macêdo, por me ensinar não só sobre plantas medicinais, Cariri, metabólitos secundários e métodos analíticos, mas também sobre silêncio que constrange os tolos, paciência e gentileza. Jamais esquecerei a forma como acreditou no meu sonho e se empenhou para torná-lo realidade.

Aos colaboradores do Iperfarm e Pesquisa Clínica, Agnaldo, Fabrício, Pedro pelo auxílio na realização das análises. À Azenate Campos, companheira de laboratório, por todos os momentos compartilhados e conversas enriquecedoras.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos recursos para desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por permitir a realização deste estudo.

À Alcira e Douglas por terem cruzado meu caminho e me ensinado tanto sobre autocuidado, amor próprio, resiliência e persistência.

Aos meus grandes amigos Danilo e Lucas por todo amor, companherismo e lealdade compartilhados ao longo de todos esses anos de amizade. Certamente, a minha jornada fica muito mais fácil graças a eles.

À minha amiga Allana Bruna que esteve comigo durante a longa jornada de desenvolvimento deste trabalho, acolhendo, rindo, conversando e dividindo tantos momentos.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) Thallison e Juliana pelas longas conversas enriquecedoras, pela escuta nos momentos de desespero e por vibrarem a cada conquista.

Aos meus amigos de graduação Iago, Joaquim, Luciana, Renata e Victor por estarem presente todos esses anos.

RESUMO

O *Ziziphus joazeiro* Mart. é árvore típica do Nordeste brasileiro, com ampla distribuição no bioma Caatinga, popularmente conhecida como juazeiro. Em virtude do alto teor de saponinas presentes, o juazeiro é uma espécie de grande interesse para uso medicinal e para as indústrias produtoras de cosméticos, porém vem sofrendo intenso extrativismo vegetal. O objetivo deste estudo foi padronizar os extratos hidroalcoólicos e secos por nebulização dos indivíduos jovens coletados em diferentes períodos de cultivo e indivíduo adulto, bem como aplicar no fitocosmético gel dentifrício, buscando obter uma fonte alternativa de matéria-prima vegetal de interesse para a indústria farmacêutica e cosmética preservando a espécie. Os extratos hidroalcoólicos dos indivíduos jovens e adulto foram obtidos por maceração em escala piloto, posteriormente, secos por aspersão utilizando o *spray dried* apresentando rendimento acima de 85%. Os métodos analíticos para quantificação de saponinas- taninos e saponinas foram validados utilizando a técnica espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 460 nm. Os parâmetros avaliados seguiram a legislação vigente brasileira demonstrando a boa sensibilidade, precisão e robustez do método analítico, confirmando a adequabilidade para análises de rotina. Os dados mostram que o conteúdo do marcador majoritário presente no indivíduo jovem cresce em função do tempo, sendo a concentração de saponinas nos extratos do juazeiro do indivíduo jovem, após dezoito meses de cultivo, maior que o do indivíduo adulto. Com base nisso, foi desenvolvida uma formulação de gel dentifrício à base de juazeiro 2,5% utilizando o extrato seco do indivíduo jovem. Realizaram-se ensaios de controle de qualidade e estudo de estabilidade preliminar durante 90 dias do gel dentifrício, observando ausência de alterações nas propriedades organolépticas e pH. Desta forma, a droga vegetal proveniente dos indivíduos jovens do *Z. joazeiro* Mart. representa uma excelente alternativa como insumo ativo farmacêutico na produção de fitocosméticos, além de reduzir consideravelmente o extrativismo predatório vegetal da espécie.

Palavras- chaves: Caatinga · Plantas Medicinais · Metabólitos Secundário · Validação Analítica · Método Colorimétrico · Formulação

ABSTRACT

Ziziphus joazeiro Mart. is a shrubby tree found in the Brazilian Northeast, with wide distribution in the Caatinga biome, popularly known as juazeiro. Due to its high content of saponins, the species is of great interest for medicine and cosmetics. The aim of this study was to standardize the hydroalcoholic and dry extracts by nebulization of young individuals collected in different periods of cultivation and adult individual, as well as to apply in phytocosmetic toothpaste gel, seeking to obtain an alternative source of vegetable raw material of interest to the pharmaceutical and cosmetic industry preserving the species. The hydroalcoholic extracts of young and adult individuals were obtained by pilot-scale macerated, subsequently dry by spray using dried spray presenting yield above 85%. The analytical methods for quantification of saponins- tannins and saponins were validated using the UV-Vis spectrophotometry technique at 460 nm wavelength. The validated parameters followed the Brazilian current legislation demonstrating the good sensitivity, accuracy and robustness of the analytical method, confirming the suitability for routine analysis. The data show that the content of the majority marker present in the young individual grows as a function of time, and the concentration of saponins in the extracts of the juazeiro of the young individual, after eighteen months of cultivation, higher than that of the adult individual. Based on this, a 2.5% juazeiro-based toothpaste gel formulation was developed using the dry extract of the young individual. Quality control assays and preliminary stability study were performed during 90 days of toothpaste gel, observing the absence of changes in organoleptic properties and pH. Thus, the plant drug from young individuals of *Z. joazeiro* Mart. represents an excellent alternative as an active pharmaceutical input in the production of phytocosmetics, besides considerably reducing the plant predatory extraction of the specimen.

Keywords: Medicinal Plants · Secondary Metabólitos · Analytical Validation · Colorimetric Method · Formulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro UV- Vis da solução padrão de Diosgenina.	56
Figura 2 - Espectro UV- Vis da solução hidroalcoólico do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.	57
Figura 3 – Curva analítica da solução padrão de diosgenina.	58
Figura 4 – Gráfico de distribuição de resíduos baseado nos valores da curva analítica da SQR.	59
Figura 5 – Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro de linearidade da solução hidroalcoólica de <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.	60
Figura 6 – Gráfico de distribuição de resíduos baseado nos valores da curva analítica da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	61
Figura 7 – Representação gráfica das curvas de calibração para avaliação do efeito da matriz no método de quantificação de saponinas-taninos.	63
Figura 8 - Espectro UV- Vis da solução hidroalcoólico do <i>Z. joazeiro</i> Mart. o LOTE 02 (A), LOTE 03 (B) e Adulto (C).	67
Figura 9 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02. B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	69
Figura 10 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	71
Figura 11 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	72
Figura 12 – Representação gráfica do conteúdo de saponinas-taninos nos diferentes estágios de crescimento.	79
Figura 13 - Captura imagem do processo de complexação de taninos –proteínas presentes nas soluções hidroalcoólicas do <i>Z. joazeiro</i> Mart. usando albumina humana.	80
Figura 14 – Espectro UV-Vis da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.	83
Figura 15 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> LOTE 01; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	84
Figura 16 - Avaliação do efeito da matriz complexa usando o paralelismo das retas da solução hidroalcoólica de <i>Z. joazeiro</i> Mart. e da mesma fortificada com solução padrão de diosgenina.	85
Figura 17 – Espectro UV-Vis da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02, LOTE 03 e Adulto.	90
Figura 18 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	91

Figura 19 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	93
Figura 20 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	94
Figura 21 - Representação gráfica da influência do tempo de cultivo no conteúdo de saponinas nos extratos de <i>Z. joazeiro</i> Mart.	100
Figura 22 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade do extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.	104
Figura 23 - Captura de imagens da preparação do gel dentifrício a base de <i>Z. joazeiro</i> . A) Gel base ; B) Gel a base de <i>Z. joazeiro</i> Mart. com 2% de agente geleificante; C) Gel a base de <i>Z. joazeiro</i> com 4% de agente geleificante.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de substâncias químicas e reagentes utilizados no estudo.....	36
Tabela 2 - Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações propostas do estudo.....	36
Tabela 3 – Nomenclatura adotada para diferenciação dos materiais vegetais e a respectiva data de coleta.	37
Tabela 4 – Níveis de concentrações utilizados para construção da curva analítica das amostras dos indivíduos jovens e adulto do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	43
Tabela 5 – Níveis de concentrações utilizados para construção da curva analítica do método saponinas das amostras dos indivíduos jovens e adulto do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ...	48
Tabela 6 – Níveis de concentrações utilizados para avaliação da precisão do método saponinas dos extratos secos dos indivíduos jovens do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	51
Tabela 7 - Lista de substâncias e suas respectivas concentrações utilizadas no preparo do gel dentifrício.....	51
Tabela 8 – Dados obtidos da caracterização físico- química do extrato hidroalcoólico do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	55
Tabela 9 – Concentrações da SQR e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica do método de quantificação de saponinas-taninos.	58
Tabela 10 - Equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) obtidos com a construção da curva analítica da SQR.	59
Tabela 11 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica do método de quantificação de saponinas-taninos.	60
Tabela 12 – Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.	62
Tabela 13 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica para avaliação do parâmetro da exatidão.	64
Tabela 14 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de valinina, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas- taninos.	65
Tabela 15 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de ácido sulfúrico, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas- taninos.....	66
Tabela 16 - Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	68
Tabela 17 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Lote 02.....	69
Tabela 18 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	70
Tabela 19 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Lote 03.....	71
Tabela 20 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	72

Tabela 21 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Adulto.....	73
Tabela 22 - Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02.....	73
Tabela 23 – Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03.....	74
Tabela 24 – Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO.....	75
Tabela 25 - Resultados Estatísticos da avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos indivíduos jovens e adulto do <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	76
Tabela 26 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02 para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	76
Tabela 27 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03 para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	77
Tabela 28 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	77
Tabela 29 – Conteúdo de saponinas- taninos em mg/g de material vegetal do <i>Z. joazeiro</i> Mart. referente aos indivíduos jovens e adulto.....	78
Tabela 30 – Volumes de albumina e as respectivas absorbâncias para seleção e otimização das condições analíticas do método de quantificação.....	81
Tabela 31 – Concentração de extrato e as respectivas absorbâncias do sobrenadante para avaliar o complexo tanino – proteína.	82
Tabela 32 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	84
Tabela 33 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.....	86
Tabela 34 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01 para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	87
Tabela 35 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de valinina, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas.	88
Tabela 36 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de ácido sulfúrico, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas.....	89
Tabela 37 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	91
Tabela 38 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Lote 02.....	92
Tabela 39 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	92
Tabela 40 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Lote 03.....	93
Tabela 41 – Concentrações da solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	94

Tabela 42 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de <i>Z. joazeiro</i> Mart. Adulto.....	95
Tabela 43 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02.....	95
Tabela 44 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03.....	96
Tabela 45 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO.....	96
Tabela 46 - Resultados Estatísticos da avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos indivíduos jovens e adulto do <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	97
Tabela 47 — Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02 para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	97
Tabela 48 — Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03 para avaliação do parâmetro da exatidão. ..	98
Tabela 49 — Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica <i>Z. joazeiro</i> Mart. ADULTO para avaliação do parâmetro da exatidão. .	98
Tabela 50 - Conteúdo de saponinas em mg/g de material vegetal do <i>Z. joazeiro</i> Mart. referente aos indivíduos jovens e adulto.	99
Tabela 51 - Concentração de taninos em mg/g de droga vegetal nos indivíduos jovens e adulto do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	101
Tabela 52 - Concentrações da solução do extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.	103
Tabela 53 - Valores de absorbância e teor das saponinas no extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 01.....	104
Tabela 54 - Valores de absorbância e teor das saponinas no extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02.....	105
Tabela 55 - Valores de absorbância e teor das saponinas no extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 03.....	105
Tabela 56 - Concentração de saponinas em mg/g de extrato seco nos diferentes lotes do <i>Z. joazeiro</i> Mart.	106
Tabela 57 - Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade em condições ambientais.....	110
Tabela 58 - Concentração de saponinas em miligrama por grama de gel dentifrício..	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DPR	Desvio Padrão Relativo
g	grama
mg	miligrama
mL	mililitros
SUDENE	Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 SEMIÁRIDO BRASILEIRO E O BIOMA CAATINGA	20
2.3 PRODUÇÃO VEGETAL	21
2.4 PLANTAS MEDICINAIS	22
2.5 <i>Ziziphus joazeiro</i> considerações gerais.....	23
2.5.1 Atividades biológicas descritas para a espécie.....	24
2.5.2 Atividade antifúngica	24
2.5.3 Atividade antiparasitária	25
2.5.4 Avaliação toxicológica.....	25
2.5.5 Atividade do potencial mutagênico.....	25
2.5.6 Constituintes químicos	26
2.6. Processos de secagem	28
2.6.1 Secagem por aspersão e aplicação em plantas medicinais.....	28
2.7 Validação de Métodos Analíticos	30
2.7.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível.....	31
2.7.2 Saponinas e método espectrofotométrico para quantificação	32
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 MATERIAIS	36
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Obtenção do Material Vegetal.....	37
4.2.2 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos.....	38
4.2.2.1. Determinação do pH	38
4.2.2.2 Determinação da Densidade Relativa.....	38
4.2.2.3 Determinação do Resíduo Seco.....	39
4.2.3 Quantificação dos metabólitos secundários presentes no <i>Z. joazeiro</i>	39
4.2.3.1 Validação do método de quantificação de Saponinas- Taninos	40
4.2.3.1.1 Seletividade	40
4.2.3.1.2 Linearidade.....	40
4.2.3.1.3 Efeito da Matriz.....	41

4.2.3.1.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	41
4.2.3.1.5 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	41
4.2.3.1.6 Exatidão.....	42
4.2.3.1.7 Robustez	42
4.2.4 Validação parcial do método de quantificação de saponinas- taninos: solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> LOTE 02, LOTE 03 e ADULTO.	42
4.2.4.1 Seletividade	43
4.2.4.2 Linearidade	43
4.2.4.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	43
4.2.4.4 Exatidão	44
4.2.5 Controle de qualidade: Correlação do teor de saponinas-taninos presente nos diferentes lotes de droga vegetal	44
4.2.6 Desenvolvimento do método analítico para quantificação de saponinas totais	44
4.2.6.1 Formação do complexo tanino-proteína.....	44
4.2.6.2 Seleção e otimização das condições analíticas.....	45
4.2.6.3 Preparação de amostras e padrão	45
4.2.6.4 Validação do método analítico de quantificação de saponinas.....	45
4.2.6.4.1 Seletividade	45
4.2.6.4.2 Linearidade.....	46
4.2.6.4.3 LD e LQ	46
4.2.6.4.4 Precisão	46
4.2.6.4.5 Efeito da Matriz.....	46
4.2.6.4.6 Exatidão.....	47
4.2.6.4.7 Robustez	47
4.2.7 VALIDAÇÃO PARCIAL DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS TOTAIS: Solução hidroalcoólica do <i>Z. joazeiro</i> Mart. LOTE 02, LOTE 03 e ADULTO.	47
4.2.7.1 Seletividade	47
4.2.7.2 Linearidade	48
4.2.7.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	48
4.2.7.4 Exatidão	48
4.2.7 Controle de qualidade do conteúdo de saponinas totais presentes no <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. e correlação entre os diferentes períodos de coleta.	48
4.2.8 PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE TANINOS PRESENTES NO <i>Z. joazeiro</i> Mart.	49
4.2.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO	49

4.2.9.1 Quantificação do conteúdo de saponinas totais no extrato seco de <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	50
4.2.9.1.1 Linearidade.....	50
4.2.9.1.2 Precisão	50
4.2.9.1.3 Determinação do conteúdo de saponinas em miligrama por grama de extrato seco.....	51
4.2.10 DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS	51
4.2.10.1 Preparo da formulação base gel dentifrício e incorporação do extrato seco de <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	51
4.2.10.2 Controle de Qualidade	52
4.2.10.2.1 Determinação das características organolépticas	52
4.2.10.2.2 Determinação de pH.....	52
4.2.10.2.3 Teste de Estresse Térmico.....	52
4.2.10.2.4 Determinação da resistência a centrifugação	53
4.2.10.2.5 Estabilidade preliminar	53
4.2.10.2.6 Ciclos de aquecimento e resfriamento	53
4.2.10.2.7 Condições ambientais de temperatura.....	53
4.2.10.2.8 Determinação do conteúdo de saponinas presentes no gel dentifrício a base de <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	54
5 RESULTADOS	55
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS- TANINOS POR UV-VIS: LOTE 01	56
5.1.1 Seletividade	56
5.1.2 Linearidade.....	57
5.1.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	62
5.1.5 Efeito da Matriz.....	63
5.1.6 Exatidão.....	63
5.1.7 Robustez	64
5.2.1 Seletividade	66
5.2.2 Linearidade.....	67
5.2.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	73
5.2.4 Exatidão.....	76
5.2.5 Controle de qualidade da droga vegetal e correlação do conteúdo de saponinas- taninos entre os indivíduos jovens e adulto.....	77
5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS POR UV-Vis	79
5.3.1 Seleção e Otimização das condições analíticas.....	80

5.3.2 Validação Do Método Analítico Para Quantificação De Saponinas Por Uv-Vis: LOTE 01	82
5.3.2.1 Seletividade	83
5.3.2.2 Linearidade	83
5.3.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	85
5.3.2.4 Efeito da Matriz.....	85
5.3.2.5 Precisão.....	86
5.3.2.6 Exatidão	87
5.3.2.7 Robustez	87
5.4 Validação Parcial do Método Analítico de quantificação de saponinas por UV-Vis: LOTE 02, LOTE 03 E ADULTO	89
5.4.1 Seletividade	89
5.4.2 Linearidade.....	90
5.4.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	95
5.4.4 Exatidão.....	97
5.4.5 Controle de qualidade da droga vegetal e correlação do conteúdo de saponinas entre os indivíduos jovens e adulto	99
5.5 QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO CONTEÚDO DE TANINOS PRESENTES NO <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. INDIVÍDUOS JOVENS E ADULTO	100
5.6 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS SECOS	102
5.6.1 Método analítico de quantificação de saponinas em extrato seco de <i>Z. joazeiro</i>	103
5.6.1.2 Linearidade e Curva Analítica	103
5.6.1.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)	104
5.6.1.4 Determinação do conteúdo de saponinas no extrato seco do <i>Z. joazeiro</i> : indivíduo jovem e adulto	105
5.7 DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS	106
5.7.1 Desenvolvimento do gel dentifrício e controle de qualidade da preparação farmacêutica	107
5.7.2 Controle de qualidade do gel dentifrício	109
5.7.2.1 Estudo de Estabilidade Preliminar	109
5.7.2.2 Determinação do conteúdo de saponinas no gel dentifrício a base de <i>Z. joazeiro</i> Mart.....	110
6 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga trata-se do único Bioma exclusivamente brasileiro com ampla biodiversidade, entretanto, possui baixo interesse para pesquisa e conservação, sendo o terceiro bioma brasileiro que mais sofre degradação (SOUZA; ARTIGAS; LIMA, 2015).

O processo de desertificação da Caatinga ocorre pela prática comum de extrativismo predatório que causa danos irreversíveis na biodiversidade da flora, além de acelerar a erosão do solo e consequentemente gerar redução na fertilidade (ARAÚJO; SOUSA, 2011; REIS et al., 2021). Entre as espécies de alta incidência no Nordeste brasileiro e que são vulneráveis à desertificação destaca-se o *Ziziphus joazeiro* (CORDEIRO et al., 2015).

Os *Ziziphus joazeiro* Mart. (recentemente classificado como *Sarcomphalus joazeiro* Mart.) são arbustos que pertencem à família das Rhamnaceae, popularmente conhecida como “juá”, “juazeiro”, “joazeiro”, “juá-babão” (HAUENSCHILD et al., 2015; ANDRADE et al., 2019; SOUZA et al., 2015). Caracterizado por sua capacidade de resistir a longos períodos de seca, o *Z. joazeiro* Mart. permanece como arbusto verde, chegando a viver até 100 anos (SILVA et al. 2016; REGO, 2019).

Estudos realizados com os extratos das folhas e cascas avaliando os aspectos fitoquímicos desta população, demonstraram a presença de inúmeros metabólitos secundária, entre eles: saponinas, flavonoides, fenóis, esteroides e triterpenoides (NASCIMENTO; TORRES; MARQUES, 2016; BRITO et al., 2015). Em virtude do alto teor de saponinas presentes tanto na casca como na folha, o juazeiro tem sido utilizado na medicina popular para tratamento de seborreia e problemas gengivais, sendo de forte interesse para fabricação de xampus, tônicos capilares e produtos para higiene bucal (REGO, 2019).

Entretanto, o crescimento lento na fase adulta, não ultrapassando a marca de 1 metro por ano, além do extrativismo predatório que pode levar a extinção da espécie, são fatores que limitam a utilização do juazeiro como insumo farmacêutico vegetal (NASCIMENTO et al., 2020).

A extensa da biodiversidade da flora brasileira, associada ao considerável conhecimento da população quanto o uso das plantas com finalidades medicinais, representa um forte aliado para o desenvolvimento das indústrias farmacêuticas de fitomedicamentos e fitocosméticos (HASENCLEVER et al., 2017).

O uso de fitocosméticos, ou seja, cosméticos que possuem como ingrediente ativo farmacêutico um produto de origem animal ou vegetal, vem crescendo significativamente, em virtude da busca da população por um estilo de vida mais natural e a crença equívocada de que são produtos mais seguros. Entretanto, os cosméticos a base de plantas devem seguir etapas de produção que compreendem os estudos de pré-formulação, desenvolvimento da preparação e estabilidade, assegurando a eficácia e segurança do produto final (ISAAC et al. 2008; AHMED et al. 2022; MAHOMOODALLY; RAMJUTTUN, 2016).

Diante do potencial do joazeiro para indústria de cosmético e visando oferecer alternativas que reduzam o extrativismo predatório do *Z. joazeiro* Mart., o presente estudo objetivou realizar caracterização físico-química dos indivíduos jovens do joazeiro coletados em diferentes estágios de crescimento, correlacionando com as propriedades do indivíduo adulto. E posteriormente, desenvolver uma preparação farmacêutica de fitocosmético tecnologicamente elaborada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SEMIÁRIDO BRASILEIRO E O BIOMA CAATINGA

O Semiárido brasileiro abrange todos os estados da região Nordeste, bem como os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, situados na região Sudeste do Brasil. Caracteriza-se pelo baixo índice de precipitação pluviométrico, com valores inferiores a 800 mm/ano, além do índice de aridez de Thornthwaite inferior a 0,50. Avaliando o déficit hídrico todos os dias do ano, observa-se valores superiores a 60% (SUPERINTENDÊNCIA, 2021).

A região citada anteriormente possui aspectos marcantes quanto a singularidade e heterogeneidade das condições climáticas, topográficas, do solo e da vegetação. Entretanto, a característica de maior destaque do semiárido trata-se do clima, possuindo um regime pluviométrico com duas estações bem marcantes: o inverno de curta duração e o verão de longa duração (MENDES, 1986). De acordo com Cavalcanti (2012), os longos períodos de seca são atribuídos ao fenômeno natural El Niño que gera prejuízos consideráveis a população da região.

Os efeitos provenientes das oscilações climáticas nas bacias hidrográficas do semiárido causam alterações significativas nos solos, o que gera impacto considerável nos processos agrícolas e, conseqüentemente, na economia e qualidade de vida da população. Tal fato demonstra a urgência do desenvolvimento de estudos norteadores de propostas que venham a contribuir com a gestão ambiental das áreas predispostas aos processos de desertificação (LIMA; MAGALHÃES, 2019; GARCIA *et al.*, 2019).

Além dos fatores climáticos, as ações humanas contribuem consideravelmente para o processo de desertificação da vegetação, em virtude de exploração agrícola desenfreada e de forma inadequada. O cultivo agrícola desordenado é datado desde o período colonial brasileiro e mantém-se até a atualidade mesmo com a publicação da Lei nº 12.651/2012, que dispõe sobre a proteção de vegetação nativa, sendo o semiárido brasileiro uma área de preservação permanente (SOUZA; RODAL, 2010).

Segundo Travassos *et al.* (2013) poucas ações governamentais são implantadas para frear o processo de desertificação da vegetação do semiárido, visualizando-se políticas públicas com baixo investimento financeiro e má gestão organizacional dos autores envolvidos. Entre os Biomas presentes nessa região delimitada pela Superintendência, cabe-se destacar o Bioma Caatinga com distribuição geográfica

exclusivamente brasileira e extensa biodiversidade biológica (MARENGO, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2003).

Segundo dados publicados pelo Ministério do Meio Ambiente (2017), a Caatinga ocupa uma faixa territorial superior a 826 mil km² que corresponde ao equivalente de 12% do território nacional, possuindo mais de 45% da sua área desmatada no ano de 2011. Além disso, o baixo interesse para fins de pesquisas, investimento e desvalorização, fazem dele o menos conhecido da América do Sul (ANA, 2014).

O referido Bioma possui como característica marcante a presença de florestas secas e vegetação arbustiva. Além disso, nos períodos de secas prolongas visualiza-se os troncos e galhos na cor branco acinzentado em virtude da perda das folhas, tal fato da origem o nome Caatinga, que do Tupi significa caa= mata e tinga= branca (SENA, 2011; TABARELLI *et al.*, 2018)

Registros apontam que a Caatinga vem sofrendo extensivo processo de desertificação ao longo dos anos por ações do homem ao realizar atividades agropastoris e extrativistas com finalidade econômica, o que causa impacto social, financeiro e ambiental significativo (MARMONTEL; RODRIGUES, 2015; LACERDA; BARBOSA; BARBOSA, 2007).

De acordo com Guedes *et al.* (2012) o estudo da composição e estrutura das espécies endêmicas da Caatinga contribui para o conhecimento dos aspectos ecológicos, fornecendo dados que podem facilitar o manejo e a utilização sustentável, além de prover elementos para o desenvolvimento do Semiárido brasileiro (PAUPITZ, 2010).

O conhecimento etnobotânico representa uma promissora fonte de informações para o desenvolvimento de produtos naturais. Vale salientar que o uso das espécies endêmicas da caatinga com finalidade medicinal são relatados desde o início do processo de exploração (TEIXEIRA, 2016). Segundo Drumond *et al.* (2000) muitas espécies são utilizadas pela comunidade local como produtos medicamentosos e de higiene pessoal, sendo explorado as folhas, cascas, frutos e raízes.

2.3 PRODUÇÃO VEGETAL

O termo produção está vinculado à tecnologia, automação e mão de obra utilizados para a obtenção de produtos acabados. Assim, voltado para produção vegetal, pode-se observar que está relacionado também às propriedades potenciais da planta e sua capacidade de responder a estímulos ambientais (SANAR, 2019).

Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o agronegócio é um dos grandes responsáveis pelo desenvolvimento da economia brasileira, participando de até 24% do Produto Interno Bruto (PIB) (MAPA, 2017).

Entretanto, um dos grandes desafios enfrentados na produção vegetal diz respeito à sustentabilidade com redução de custos, além de aumentar a produtividade e a rentabilidade. Entre as subáreas da produção vegetal cabe-se destacar: fertilidade do solo, fruticultura, gênese do solo, grandes culturas, manejo de pragas e plantas daninhas, melhoramento genético, microbiologia do solo, nutrição das plantas, produção de sementes e outros (UCEFF, 2019).

2.4 PLANTAS MEDICINAIS

Uma das mais antigas formas de práticas médicas da humanidade trata-se da utilização de plantas com finalidade medicinal para tratamento, cura e prevenção de doenças. Nos dias atuais ainda é frequente a utilização de plantas medicinais, em especial no contexto de populações carentes ou de difícil acesso a centros de saúde (JUNIOR; PINTO, 2005; MACIEL; PINTO; JUNIOR, 2002).

Os conhecimentos adquiridos com as experiências obtidas por meio do uso das plantas medicinais são passados de geração para geração, gerando dados que configuram uma importante fonte de obtenção de novos compostos bioativos para tratamento de doenças. Outro fator que causa a aceitabilidade do uso de plantas medicinais pela população diz respeito à crença equivocada sobre a inexistência de reações adversas e toxicidade por serem de origem natural (SILVA; ALMEIDA, 2020; GROSS *et al.*, 2019).

A grande biodiversidade vegetal do território brasileiro configura um potencial estimulante para o desenvolvimento da prática de utilização de plantas com fins medicinais. Além disso, outro fator relevante trata-se dos incentivos governamentais do Ministério da Saúde através da publicação da Portaria nº 971 em 03 de Maio de 2006, que incluiu o uso de plantas medicinais e fitoterapia como Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2014; BRASIL, 2006).

Inúmeros estudos divulgados na literatura reportam a utilização de espécies vegetais da região Nordeste para tratamento de doenças (MARREIROS *et al.*, 2015; NASCIMENTO- JUNIOR *et al.*, 2021; VIRGÍNIO *et al.*, 2018; ALVES; MEIRELES; LEMOS, 2017; RODRIGUES; ANDRADE, 2014; MOSCA; LOIOLA, 2009).

Entre as árvores típicas do Nordeste brasileiro, utilizada na medicina popular com ampla distribuição no Bioma Caatinga, cabe-se destacar o gênero *Ziziphus* que pertence à família das Rhamnaceae, sendo popularmente conhecida como “juá”, “juazeiro”, “joazeiro”, “juá-babão” (ANDRADE et. al., 2019; SOUZA et. al., 2015).

2.5 *Ziziphus joazeiro* considerações gerais

A família das Rhamnaceae possui cerca de 58 gêneros e 900 espécies com vasta distribuição nas regiões tropicais, podendo ocorrer também em algumas regiões de clima temperado. No Brasil, por sua vez, apresenta 13 gêneros e 48 espécies dessa família nos diferentes biomas (LIMA E GIULIETTE, 2014).

As plantas do gênero *Ziziphus* pertencente à família das Rhamnaceae e possuem distribuição cosmopolita, sendo catalogadas mais de 58 espécies pertencentes a esse gênero. Entre elas, cabe destacar o *Ziziphus joazeiro* Mart. com forte impacto socioeconômico encontrado nos países da América do Sul, em especial Brasil e Paraguai (The List Plant, 2013; MAAINDEN et. al., 2019).

As árvores do *Z. joazeiro* Mart. na fase adulta podem atingir até 16 metros de altura com tronco reto ou tortuoso, apresentando bastantes ramos separados. As folhas, por sua vez, possuem formato ovalado ou elíptico, medindo cerca de 3 a 10 centímetros de comprimento (cm) por 2 a 6 cm de largura. As flores apresentam-se com pequenas dimensões de coloração amarelo- esverdeada (CARVALHO, 2007).

As folhas e frutos configuram- se como um recurso valioso nos períodos de seca do Nordeste brasileiro por serem utilizados para alimentar os animais. Além disso, a casca possui alto teor de saponinas gerando formação de espuma com pouca quantidade de água, servindo na produção de sabão e produtos de higiene pessoal (ARAÚJO et al. 2015).

Conhecido quanto o uso popular, o juazeiro tem aplicação para o tratamento de tosse, asma, febre, males intestinais, gengivite, complicações fúngicas com surgimento de dermatites e micoses, sendo as partes mais utilizadas a casca, entrecasca e folhas preparados na forma de lambedor, xarope ou chá (MAGALHÃES; BANDEIRA; MONTEIRO, 2020; CRUZ et al., 2007).

Um levantamento etnofarmacológico realizado por Oliveira (2015) no município de Cuité (Paraíba), buscou identificar quais plantas eram mais citadas para o tratamento de micoses superficiais. Os dados mostraram que mais de 74% dos 116 indivíduos

entrevistados, na faixa etária de 14 a 84 anos, apontaram o juazeiro como primeira escolha.

Rego (2019) desenvolveu um estudo na cidade de Serra Verde, estado do Pernambuco, com a finalidade de investigar a utilização do juazeiro na comunidade local. Os dados obtidos apontam que 82% dos entrevistados utilizavam o juazeiro com finalidade terapêutica, sendo a raspa a parte mais citada para a produção de xarope antitussígeno.

2.5.1 Atividades biológicas descritas para a espécie

Brito et al. (2014) utilizaram um pó liofilizado partindo do extrato hidroalcolico proveniente das folhas do *Z. joazeiro* Mart. para proceder com os ensaios farmacológicos. Os autores avaliaram atividade antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária e citotoxicidade.

Melo et al. (2012) obtiveram os extratos hidroalcolicos obtidos das partes aéreas do *Z. joazeiro* Mart.: casca do caule, folhas e frutos por maceração durante 7 dias e posteriormente, avaliaram utilizaram o método de difusão em ágar para investigar a atividade antimicrobiana dos extratos contra leveduras, microorganismos gram-positivo, gram-negativo e *Mycobacterium bovis*. O estudo observou que o extrato hidroalcolico proveniente da casca do caule possuía maior atividade antimicrobiana quando comparada as outras partes aéreas do *Z. joazeiro* Mart, apresentando atividade frente a *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.5.2 Atividade antifúngica

Um estudo avaliou a atividade antifúngica dos extratos aquosos do *Z. joazeiro* Mart frente a cinco espécies de fungos patógenos: *Candida albicans* (ATCC18804), *Candida guilliermondii* (ATCC6260), e estirpes clínicas de *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cryptococcus neoformans*. Os autores observaram que apenas o extrato aquoso obtido por infusão apresentava significativa atividade antifúngica, podendo ser justificado com base na parte da planta utilizada para obtenção do extrato (CRUZ et al. 2007).

2.5.3 Atividade antiparasitária

Ao analisar a atividade antiparasitária dos extratos salinos da folha do *Z. joazeiro* Mart. sob ovos de parasitas gastrointestinais de caprino verificou-se uma capacidade de inibição de eclosão dos ovos de forma dose- dependente. Os ovos foram incubados a 27 °C por 24horas em poços contendo solução salina de *Z. joazeiro* Mart. em diferentes concentrações: 20,28; 10,14; 5,07; 2,53 mg/mL, sendo a maior concentração avaliada a que causou maior porcentagem de inibição de eclosão dos ovos (BARBOSA, 2019).

2.5.4 Avaliação toxicológica

Em um estudo, avaliou-se o potencial toxicológico das soluções salinas da folha do *Z. joazeiro* Mart. O ensaio foi conduzido em poços contendo nauplios eclodidos de *Artemia salina*, 100 µL de solução de cultivo de *A. salina* e 400 µL das soluções salinas de *Z. joazeiro* Mart. em diferentes concentrações. O estudo visualizou uma concentração letal média (CL50) de 10,14mg/mL que é superior a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo, sugerindo que a referida concentração pode ser utilizada no esquema terapêutico para *A. salina* (BARBOSA, 2019).

2.5.5 Atividade do potencial mutagênico

O extrato glicólico proveniente da casca do *Z. joazeiro* Mart. foi utilizado para avaliação da sua capacidade mutagênica (castrogenicidade/aneugenicidade) por meio do método de micronúcleos em medula óssea de camundongos. O estudo foi conduzido avaliando-se os animais após 24- 48horas de exposição ao controle positivo (doxorrubicina e N-nitroso-N-etilureia), controle negativo (15 mM NaCl), bem como após o tratamento com o extrato glicólico. A ausência de mutagenicidade e toxicidade foi observada nos ensaios de antimutagenicidade, sugerindo que os compostos fitoquímicos presentes no *Z. joazeiro* Mart. reduzem a mutagenicidade ocasionada pela doxorrubicina (BORIOLLO et al., 2014).

Por sua vez, Resende et al. (2009) avaliaram a capacidade mutagênica e antimutagênica dos extratos hidroalcólicos do *Z. joazeiro* Mart. Os autores utilizaram seis grupos experimentais de camundongos: 500, 1000, 1500 e 2000 mh/Kg; 2000mg/Kg + 50mg/Kg N-Nitroso-N-ethylurea (NEU); 2000mg/Kg + 5mg/Kg Doxorrubicina (DXR). Além dos controles negativos (NaCl 0,9%) e controle positivo (NEU; DXR). A avaliação dos eritrócitos policromáticos micronucleados sugeriu a ausência do potencial mutagênico e uma discreta tendência antimutagênica dos extratos quando associado com doxorrubicina.

2.5.6 Constituintes químicos

Um estudo realizado por Higuchi et al. (1984) realizou o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários presentes na casca do *Ziziphus joazeiro* Mart. Os autores identificaram a presença de três saponinas triterpênicas inéditas que possuíam como diferenças principais a porção glicídica. A jujubogenina foi a primeira saponina isolada, que está ligada a β -D- glicopiranosose (molécula de glicose), α -L-arabinofuranose e α -L-arabinopiranosose. As outras duas moléculas de saponinas isoladas e caracterizadas foram uma jujubogenina ligada a uma porção glicídica que apresenta a porção glicona monosulfatada, a 4'''-O-sulfato, e uma jujubogenina com a porção glicona disulfatada (3'',4'''-di-O-sulfato).

Em seguida, um estudo desenvolvido por Barbosa-Filho, Trigueiro e Bhattacharyya (1985) investigou os metabólitos secundários presentes na casca do caule após extração utilizando clorofórmio e metanol. Os pesquisadores avaliaram a fração clorofórmica por meio da técnica de cromatografia líquida em coluna e a fração metanólica por cromatografia em gel de filtração. Os processos extrativos isolaram da casca do caule do *Z. joazeiro* Mart. ácido oleanólico, ácido betulínico e uma saponina que quando submetida a hidrólise ácida fornecia lactona eobilin.

Kato et al. (1997) seguindo as etapas do processo de extração, isolamento e purificação conseguiram identificar lupeol, ácido betulínico, cafeína e estearato de glicerila das cascas do caule do *Z. joazeiro* Mart. utilizando técnicas espectroscópicas convencionais e cromatografia.

Em 1999, um novo estudo foi desenvolvido visando realizar investigação fitoquímica da casca do caule do *Z. joazeiro* Mart. As rapas das cascas foram submetidas a subseqüentes etapas de percolação com n-hexano, diclorometano, metanol e metanol: água (70:30), e posteriormente analisadas por cromatografia em coluna. O estudo identificou a presença de 3 compostos já conhecidos (ácido betulínico, ursólico e alfitólico) e 3 novos compostos, sendo eles: ácido betulínico 7- β -O-(4-hidroxibenzoiloxi), ácido betulínico 7- β -O-(4-hidroximetoxibenzoiloxi) e ácido betulínico 27-O-(4-hidroximetoxibenzoiloxi). Em seguida, os mesmos autores isolaram da casca 4 saponinas triterpênicas, sendo 3 delas inéditas na literatura (SCHUHLY et al., 1999; SCHUHLY et al., 2000).

Ao longo do tempo, as pesquisas fitoquímicas dos metabólitos secundários presentes no *Z. joazeiro* Mart. eram direcionadas para as cascas do caule. Entretanto, estudos preliminares foram evoluindo ao longo dos anos visando identificar e caracterizar

os metabólitos presentes nas folhas, frutos e sementes. Silva (2018) realizou um paralelo comparativo entre os extratos metanólicos provenientes das folhas e caules dos indivíduos jovens e adultos, utilizando cromatografia em camada delgada. O autor identificou a presença de saponinas, mono e sesquiterpenos, e esteróides em todas as partes analisadas. Além disso, visualizou que apenas as folhas apresentavam flavonoides, assim como, apenas o caule da parte adulta possuía derivados de ácido cinâmico e cumarinas.

Seguindo as análises preliminares, Melo et al. (2012) investigou o perfil fitoquímico dos extratos etanólicos das folhas, frutos e caule. Os autores identificaram a presença de saponinas, terpenos, esteroides na casca e alcaloides, saponinas, taninos, terpenos e esteroides na folha.

Brito et al. (2014) preparam um extrato hidroalcólico das folhas do *Z. joazeiro* Mart. por maceração e, em seguida, realizaram a caracterização fitoquímica para determinar a presença metabólitos secundários baseando-se em leituras colorimétricas e formação de precipitados. Posteriormente, quantificaram a composição dos constituintes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotiodo. A triagem fitoquímica verificou a presença de saponinas, flavonoides, taninos e fenóis no extrato hidroalcólico das folhas do *Z. joazeiro* Mart. A análise química por meio de cromatografia líquida revelou a presença de ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, epicatequina, rutina, isoquercetina, quercetina e canferol.

2.6 CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O controle de qualidade das matérias-primas e preparações farmacêuticas é um conjunto de procedimentos que devem ser realizados não somente no produto acabado, bem como durante todo o processo de produção (PINTO, 2014).

No processo de produção de medicamentos fitoterápicos é imprescindível manter a integridade química dos metabólitos secundários, fim de garantir a eficácia terapêutica. Aspectos como granulometria dos pós, técnicas de secagem, sistemas de solventes influenciam consideravelmente na estabilidade e qualidade do produto final obtido (CUINICA; MACEDO, 2019).

Na literatura diversos estudos reportam a utilização de métodos analíticos para auxiliar no desenvolvimento tecnológico e avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais com potencial atividade terapêutica comprovada (CARTAXO- FURTADO et al., 2019; ANDRADE et al., 2019b; GUIMARÃES et al, 2018; LEITE et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

Fernandes e colaboradores (2018), realizaram o controle de qualidade das folhas *Spondias dulcis* fornecendo informações acerca de identificação e caracterização fitoquímica do material vegetal para futuros estudos no que desrespeito ao desenvolvimento de um novo fitoterápico.

Cuinica e Macedo (2019) avaliaram a influência dos processos tecnológicos para obtenção de fármacos da planta medicinal *Urtica dioica* L. Os autores investigaram a influência de dois diferentes processos de secagem para obtenção dos extratos secos: spray-dried e estufa. Além disso, avaliaram as características tecnológicas das amostras em diferentes tamanhos de partículas utilizando termogravimetria, análise térmica diferencial e cromatografia gasosa acoplada. O estudo evidenciou que os extratos secos por aspersão levaram maior tempo para que houvesse 5% de degradação, caracterizando uma maior estabilidade. O inverso foi visualizado para aqueles que possuíam menor tamanho de partícula, havendo degradação mais rápida.

2.6. Processos de secagem

Os extratos secos possuem maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, além de maior concentração dos metabólitos secundários, se comparados aos extratos líquidos. Além disso, possuem como vantagens a facilidade de padronização e adequação para o desenvolvimento de formas farmacêuticas tais como comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas, géis, ou como produto intermediário (CORDEIRO, 2000).

Os compêndios oficiais descrevem que os extratos secos são preparações sólidas com características pulverulentas ou granuladas, provenientes da evaporação dos solventes presentes nos extratos de plantas medicinais, com adição ou não de adjuvantes. Entre as principais técnicas utilizadas para obtenção dos extratos secos tem-se a liofilização, evaporação rotativa e por spray-dryer (RUNHA et al., 2001; SILVA et al., 2012).

2.6.1 Secagem por aspersão e aplicação em plantas medicinais

A secagem por aspersão caracteriza-se por promover a secagem das amostras no estado fluído por meio de altas temperaturas transformando-as em pó, sendo também denominada de secagem por atomização ou por nebulização.

O processo de secagem consiste basicamente em 5 etapas características. A primeira etapa trata-se da preparação da amostra que normalmente encontra-se

concentrada para ser inserida no secador por aspersão. Posteriormente, a etapa de aspersão, onde seleciona-se as condições necessárias de operação para realização da terceira etapa que consiste na introdução do líquido no atomizador para entrar em contato com o ar quente. A quarta e quinta etapa fundamentam-se na secagem do material e em seguida a separação com auxílio do ciclone (SOUZA et al., 2013).

Algumas variáveis influenciam significativamente o rendimento do produto seco, sendo elas: temperatura de entrada do ar de secagem, bem como a vazão do ar e do líquido, além da pressão de atomização. Por outro lado, alguns parâmetros podem ser modificados pelo analista visando otimização do processo, tais como temperatura de saída do ar e o tamanho da gotícula gerada (CAL; SOLLOHUB, 2010).

A secagem por aspersão representa uma estratégia vantajosa para indústria farmacêutica na produção de matéria-prima e desenvolvimento de fármacos por se tratar de uma operação versátil, simples e robusta (RÉ et al., 2007). Por meio dessa tecnologia pode-se ter um maior controle no tamanho da partícula gerada, grau de cristalinidade, bem como a umidade e solvente residual (PATIL et al., 2016).

A tecnologia de secagem por nebulização tem sido usada com frequência na produção de extratos secos a partir de extratos fluídos provenientes de drogas vegetais (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).

Um estudo realizado por Ravazoli (2019) obteve extrato seco a partir das folhas de Mouriri pusa Gardner (Melastomataceae) e posteriormente realizou a caracterização selecionando flavonoides como marcadores de interesse. O autor avaliou a influência do fluxo de alimentação, concentração do adjuvante farmacêutico e temperatura de entrada no rendimento, umidade e concentração dos flavonoides. Ao final concluíram que uma temperatura de entrada de 160°C com 50% de aerosil e fluxo de alimentação de 6mL/minutos obtinha um extrato seco com rendimento superior a 75% e teor de flavonoides de 0,71%.

Junior et al. (2006) partiu de um extrato fluído de *Symphytum officinale* L. para obter um extrato seco por aspersão e posteriormente, realizou caracterização físico-química utilizando técnicas termogravimétrica, espectrofotométrica e cromatográfica. Os autores identificaram que a melhor concentração do adjuvante farmacêutico hidroetilcelulose era de 1,5%, além de visualizar que o processo de secagem não interferia nos constituintes do extrato seco quando comparado com o extrato fluído.

Vasconcelos et al. (2005) avaliou a influência da temperatura de entrada e concentração do adjuvante farmacêutico, dióxido de silício coloidal, na obtenção dos

extratos secos de *Schinus terebinthifolius Raddi*. Os autores identificaram que a medida que se aumentava a temperatura de entrada e a concentração do adjuvante farmacêutico ocorria uma redução na umidade residual e consequentemente, na higroscopicidade. Ao final do estudo, estabeleceram que 140°C e 30% de dióxido de silício coloidal representavam as condições ideais, obtem extratos com rendimento superior a 70%.

2.7 Validação de Métodos Analíticos

De acordo com a resolução vigente no Brasil, a RDC nº 166, publicada em 24 de Julho de 2017, a validação de um método analítico refere-se a uma avaliação sistemática por meio de ensaios que objetiva garantir que o método proposto apresenta conformidade aos requisitos ao qual se destina (BRASIL, 2017).

Entre os parâmetros analíticos que devem ser avaliados para garantir a validação do método tem-se a seletividade, linearidade e intervalo, efeito da matriz, precisão que se subdivide em repetibilidade e precisão intermediária, exatidão, robustez, limites de quantificação e detecção, e o teste de adequabilidade do sistema (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005 ; HAECKEL; SONNTAG, 2012; BONFILIO et al., 2012; BRASIL, 2017).

A seletividade caracteriza-se pela capacidade do método analítico identificar e quantificar o analito de interesse na presença de outros constituintes da amostra analisada, quer seja impureza, produto de degradação ou até mesmo outros compostos que fazem parte da matriz (BRASIL, 2017).

O poder de obter uma resposta analítica diretamente proporcional a concentração do analito de interesse presente na amostra trata-se da linearidade, que deve ser avaliada também quanto os coeficientes de determinação e correlação, homoscedasticidade e distribuição dos resíduos. Por meio da equação da reta gerada com o modelo de regressão linear pode-se calcular os limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Os limites de detecção e quantificação representam a menor concentração que o analito de interesse pode ser detectado e quantificado, respectivamente. Como mencionado anteriormente, podem ser estimado utilizando as informações provenientes do parâmetro da linearidade, tais como inclinação da curva e o desvio. Entretanto, faz-se necessário análises experimentais para confirmação dos valores encontrados (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2017; AMARANTE et al., 2001).

Conforme a legislação brasileira vigente, o parâmetro da precisão mede a proximidade dos resultados gerados com amostras independentes que podem ser analisadas em dias consecutivos por diferentes analistas. A precisão subdivide-se em repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011; SILVA *et al.*, 2014). A repetibilidade avalia a proximidade dos resultados em um curto intervalo de tempo com análises realizadas em um mesmo dia, já a precisão intermediária avalia as variações existentes quando muda-se o ambiente ou o analista. A reprodutibilidade, por sua vez, é recomendada quando realiza-se transferência de tecnologia entre diferentes laboratórios (BRASIL, 2017).

A medição entre concentração teórica e concentração experimental expressa em porcentagem de recuperação trata-se da avaliação do parâmetro da exatidão. A resolução preconiza que seja realizada em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) com adição de uma concentração conhecida da substância química de referência (BRASIL, 2017).

Por fim, o parâmetro da robustez pode ainda ser avaliado na etapa inicial de desenvolvimento do método, visto que ele avalia a capacidade do método analítico em resistir a pequenas mudanças ocasionadas deliberadamente. Algumas modificações são sugeridas pela legislação brasileira, tais como mudança de pH, fluxo de fase móvel, modificação nos fornecedores dos reagentes, entre outros (BRASIL, 2017).

2.7.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível

Segundo a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, as técnicas espectrofotométricas fundamentam-se na absorção de energia eletromagnética por moléculas, que sofre influência da concentração presente na amostra e das estruturas químicas relacionadas. Essas técnicas são caracterizadas com base na frequência da energia eletromagnética aplicada, podendo ser ultravioleta, visível e infravermelho. As regiões do ultravioleta (UV) e do visível (Vis) apresentam faixas de comprimento de onda de energia eletromagnética entre 100-380 nanômetros e 380-780 nanômetros, respectivamente (BRASIL, 2019).

A espectrofotometria de absorção UV-Vis possui ampla aplicação em laboratórios de análises físicas, químicas, biológicas e farmacológicas, além de apresentar como características vantajosas marcantes a facilidade de operação, obtenção de

resultados confiáveis e de fácil interpretação, bem como ser utilizado para análises quantitativas (GALO; COLOMBO, 2009).

Paralelamente, vale salientar que a literatura reporta inúmeros estudos com a aplicação da espectrofotometria UV-Vis na realização do controle de qualidade e determinação de metabólitos secundários presentes em drogas vegetais, extratos fluídos e secos (MARQUES *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013; VIGO *et al.*, 2003).

Gomes *et al.* (2021) desenvolveu uma metodologia analítica de quantificação de equivalente de ácidos tânico por espectrofotometria Uv-Vis em extratos hidroalcoólicos de folhas de *Syzygium cumini* L. Skeels. Os autores selecionaram o comprimento de onda de 706nm para conduzir as análises dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Ao final do estudo, conseguiram propor a metodologia avaliada como adequada para padronização e caracterização de drogas vegetais.

Em um outro estudo, foi proposta uma metodologia analítica de quantificação de taninos presentes nas partes aéreas e periderme do caule de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível. Os autores seguiram a validação do método analítico com base nos parâmetros preconizados pela legislação vigente no Brasil, RDC nº 166/2017, e obtiveram resultados satisfatórios, propondo uma metodologia rápida e de fácil interpretação para quantificação do metabólito secundário em diferentes partes da planta utilizando espectrofotômetro UV-Vis (GOMES *et al.*, 2021).

2.7.2 Saponinas e método espectrofotométrico para quantificação

As saponinas representam uma importantíssima classe de metabólitos secundários presentes no reino vegetal em virtude de suas atividades biológicas e capacidade de formar espuma em soluções aquosas (SCHENKEL *et al.*, 2003). Elas podem ser classificadas em dois grupos conforme a natureza do esqueleto da porção aglicona, sendo saponinas esteroidais e triterpênicas, com ampla distribuição nas angiospermas mono e dicotiledôneas, respectivamente (SPARG; LIGHT; STADEN, 2004).

O núcleo terpenóide é sintetizado pela via do ácido mevalônico a partir da unidade do isopentenildifosfato, sendo a quantidade do número de carbonos norteador

para classificação, aqueles com 10 carbonos são classificados como monoterpenos, 15 carbonos sesquiterpenos e 30 carbonos os triterpenos. Tanto as saponinas triterpênicas, como as esteroidais, são derivadas do precursor comum, o oxidoesqualeno de 30 carbonos. Entretanto, as saponinas esteroidais possuem três grupos metil a menos que as triterpênicas, possuindo apenas 27 carbonos (VINCKEN *et al.*, 2007).

Dentre as inúmeras atividades das saponinas descritas na literatura, cabe-se destacar a atividade imunomodulatória, anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante e citotóxica (POTHIARAJ *et al.*, 2022; CHANG *et al.*, 2023; WEI *et al.*, 2022).

Paralelamente, vale salientar que as saponinas possuem como propriedade marcante a capacidade de desenvolver espuma quando adicionadas em soluções aquosas, em virtude da presença de uma porção aglicona apolar e um açúcar polar (BISWAS; DWIVEDI, 2019). Com base nas inúmeras aplicações reportadas, bem como a abundância nas espécies vegetais, as saponinas são de grande interesse para a indústria farmacêutica, de alimentos e cosméticos (MOSES *et al.*, 2014; WYKOWSKI, 2012).

O procedimento prévio a quantificação de saponinas presentes em material vegetal trata-se da verificação da formação de espumas. Inicialmente, deve-se adicionar o material em um tubo de ensaio contendo água destilada e realizar agitação vigorosa por 2 minutos. Havendo o surgimento de espuma persistente na superfície do líquido por 15 minutos, pode-se inferir que há presença de saponinas no material vegetal analisado (NCUBE *et al.*, 2011). Métodos espectrofotométricos e cromatográficos são utilizados rotineiramente para realização da quantificação de saponinas (CHEOCK; SALMAN; SULAIMAN *et al.*, 2014).

Os métodos espectrofotométricos apresentem como vantagens a simplicidade e facilidade de realização, além de fornecer resultados rápidos e com baixo custo, sendo possível determinar o conteúdo total de saponinas presentes em matrizes vegetais por meio do ensaio ácido sulfúrico-vanilina (LI *et al.*, 2010).

O princípio básico do ensaio ácido sulfúrico-vanilina caracteriza-se pela reação de oxidação da vanilina com as saponinas, enquanto que o ácido sulfúrico atua como oxidante que ao final do processo reacional irá desenvolver a coloração roxa (LI *et al.* 2010; HIAI; OURÁ; HAKAJIMA, 1976). Alguns estudos apontam a utilização de outro agente para atuar como oxidante no meio reacional, sendo o mais utilizado o ácido perclórico (CHEN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2001). Entretanto, a literatura não aponta uma padronização quanto o tempo e temperatura para desenvolvimento do

processo reacional, bem como os padrões, reagentes e comprimento de onda que devem ser selecionados.

A literatura aponta outro método espectrofotométrico para determinação de saponinas em material vegetal, o método hemolítico (BARVE; LADDHA; JAYAKUMA, 2010). O fundamento baseia-se na reação de um reagente de sangue com as saponinas presentes no material analisado, liberando oxi-hemoglobina no meio reacional que é responsável por desenvolvimento de coloração característica mensurável na espectrometria (HABICHT *et al.*, 2011)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a droga vegetal e o insumo ativo farmacêutico proveniente do indivíduo jovem do *Ziziphus joazeiro* Mart. e sua aplicação no produto farmacêutico tecnológico elaborado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e pulverizar as drogas vegetais pulverizadas dos indivíduos novos em diferentes estágios de crescimento, bem como o indivíduo adulto fornecidas pela Fundação de Apoio a Biotecnologia e Inovação Tecnológica em Saúde do município de Serra Branca- Paraíba;
- Obter os extratos hidroalcóolicos dos indivíduos jovens e adulto pela técnica de maceração;
- Realizar caracterização físico- química dos extratos hidroalcóolicos;
- Desenvolver e validar metodologia de quantificação de saponinas- taninos e saponinas totais por espectrofotometria UV/Vis;
- Correlacionar o conteúdo do marcador majoritário no indivíduo jovem com o da espécime adulta;
- Obter os extratos secos dos indivíduos jovens e adulto por *spray dried*.
- Determinar o conteúdo de saponinas por espectrofotometria UV/Vis;
- Propor uma preparação farmacêutica de gel dentrífico a base de *Ziziphus joazeiro* Mart.;
- Determinar o conteúdo do marcador majoritário no gel dentrífico por espectrofotometria UV/Vis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A Tabela 01 apresenta a lista de reagentes utilizados durante o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para quantificação de saponinas e taninos presentes no *Z. joazeiro* Mart.

Tabela 1 - Lista de substâncias químicas e reagentes utilizados no estudo.

Reagentes/Substâncias	Lote	Fornecedor	Aplicação
Acetato de Sódio	27220	Alphatec	Formação do complexo tanino-proteína
Ácido Sulfúrico	PMA067115	Qhemis	Reação de quantificação de saponinas e taninos
Albumina Humana 20%	2564825	GSL Behring	Formação do complexo tanino-proteína
Cloreto de Sódio	2005004R	Neon	Formação do complexo tanino-proteína
Diosgenina (SQR)*	SLBV7807	Sigma	Reação de quantificação de saponinas e taninos
Etanol	49050	Quimidrol	Obtenção dos extratos
Metanol	00217986	Qhemis	Reação de quantificação de saponinas e taninos
Vanilina	36356	Neon	Reação de quantificação de saponinas e taninos

* SQR substância química de referência

As matérias-primas utilizadas para o desenvolvimento da preparação farmacêutica, gel dentifrício, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações propostas do estudo.

Classe Terapêutica ou Classificação Adjuvante			
Extrato Seco <i>Z. joazeiro</i>			Ingrediente Ativo Farmacêutico
Carboximetilcelulose			
Glicerina			Umectante
Lauril Sulfato de Sódio			Tensoativo
Sacarina Sódica			Edulcorante
Óleo	Essencial	Alecrim	Flavorizante
Pimenta			

Os excipientes farmacêuticos utilizados para o desenvolvimento da formulação propostas foram selecionados baseados na preparação farmacêutica descrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição. A formulação selecionada

para incorporação do extrato seco de *Z. joazeiro* Mart. foi gel dentifrício, sendo realizadas modificações que melhor atendessem as características tecnológicas do produto final.

A preparação farmacêutica desenvolvida seguiu os parâmetros preconizados pela RDC nº 301, de 21 de Agosto de 2019, que dispõe das diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

4.2 MÉTODOS

O desenvolvimento do presente estudo seguiu baseando-se no processo de produção representativo e reprodutivo de um lote de produção em escala ampliada, ou seja, a produção dos lotes de extratos do *Ziziphus joazeiro* Mart. foram realizados em escala piloto, buscando avaliar de forma criteriosa as características e a qualidade dos produtos obtidos. Além disso, foi possível determinar pontos críticos durante todo o processo de desenvolvimento e produção.

4.2.1 Obtenção do Material Vegetal

As drogas vegetais pulverizadas foram fornecidas pela Fundação de Apoio a Biotecnologia e Inovação Tecnológica em Saúde (FUNBITS). Os indivíduos jovens do *Ziziphus joazeiro* foram coletadas no Sítio Queimada, município de Serra Branca (7° 30' 16,66" S 36° 42' 01,00" O), situado no estado da Paraíba, com a primeira coleta realizada em Março de 2020 e as subsequentes respeitando um intervalo de seis meses entre elas, até completar dezoito meses. A fim de realizar um paralelo comparativo do teor de saponinas presentes nos indivíduos jovens e adulto de *Ziziphus joazeiro* Mart., foi realizada coleta do indivíduo adulto na mesma região citada anteriormente.

A FUNBITS forneceu os Lotes 01, 02, 03 e Adulto nos períodos contantes na Tabela 3.

Tabela 3 – Nomenclatura adotada para diferenciação dos materiais vegetais e a respectiva data de coleta.

DATA DA COLETA	MATERIAL VEGETAL
Março/2020	LOTE01
Agosto/2020	LOTE02
Fevereiro/2021	LOTE03
Março/ 2021	ADULTO

Após a coleta, o material vegetal foi higienizado com hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos e em seguida lavado com água destilada, objetivando a retirada de materiais estranhos. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 40 ± 2 °C por três dias. Após a secagem, foi triturado usando moinho de facas.

Um exemplar foi coletado pela Doutora Azenate Campos Gomes, que atua na FUNBITS, para realização da identificação e confecção da exsicata. Uma espécime foi identificada pela bióloga Maria do Ceo R. Pessoa, Universidade Federal de Paraíba, e uma exsicata está depositada no herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, sob número JPB 66.863. A pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número A24ADFB.

4.2.2 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos

Foram obtidos extratos hidroalcoólicos a 10% para cada um dos materiais vegetais do *Z. joazeiro* Mart. coletados. Três quilogramas do material vegetal foram submetidos ao processo extrativo por maceração em 30 litros de solução hidroalcoólica a 50% (etanol 50%) por cinco dias consecutivos à temperatura ambiente, sob agitação esporádica. Posteriormente, as soluções obtidas foram filtradas utilizando algodão e papel filtro com auxílio de uma bomba a vácuo.

Os extratos hidroalcoólicos tanto do indivíduo jovem como do adulto foram caracterizados seguindo os métodos descritos na Farmacopeia Brasileira (2019). As análises realizadas foram a determinação do pH, densidade relativa e determinação do resíduo seco. Já para a validação dos métodos analíticos procedeu-se utilizando o extrato hidroalcoólico Lote 01.

4.2.2.1. Determinação do pH

Previamente à determinação do pH das soluções hidroalcoólicas dos indivíduos jovens e adulto, foi realizada a calibração do potenciômetro utilizando soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. As medições foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.2 Determinação da Densidade Relativa

A densidade foi determinada utilizando o método do picnômetro. Inicialmente realizou-se a calibração da vidraria limpa e seca, onde foram encontradas as massas para o picnômetro vazio e dele contendo água destilada. Em seguida, foi transferida a amostra

e obtido o peso. Os valores reais de massa são obtidos pela diferença do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi obtida pela razão entre a massa da amostra e a massa da água.

4.2.2.3 Determinação do Resíduo Seco

As determinações de resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos foram conduzidas utilizando aproximadamente 2,0 mL dos extratos pesados em cápsulas de porcelana. As cápsulas foram conduzidas a estufa da Nova Ética (modelo 400/1ND) por 2 horas à 105 °C. Transcorrido o tempo estabelecido, às amostras foram encaminhadas para o dessecador até o resfriamento completo. Posteriormente, foi realizado a pesagem. Os resultados foram expressos em porcentagem (m/v).

4.2.3 Quantificação dos metabólitos secundários presentes no *Z. joazeiro*

Um levantamento bibliográfico realizado por Maaiden e colaboradores (2019) apontou que os principais metabólitos secundários presentes no *Z. joazeiro* Mart. tratam-se de alcaloides, saponinas, compostos fenólicos e flavonoides, sendo as saponinas o marcador majoritário da espécie. O método colorimétrico vanilina-acidificada vem sendo o mais empregado para quantificação de saponinas em plantas medicinais.

Entretanto, diversos estudos reportados na literatura demonstraram a aplicabilidade do ensaio colorimétrico vanilina- acidificada para quantificação de taninos e saponinas (PALACIOS et al. 2021; MONTEIRO et al. 2005; BROADHURST, JONES, 1978; SURESH et al.,2021; MOHLAKOANA, MOTEETEE, 2021). Visando obtenção de resultados mais precisos e robustos quanto ao conteúdo de cada marcador avaliado, aplicamos a estratégia de formação de complexo taninos-proteínas para retirada dos taninos presentes e quantificação inequívoca das saponinas.

Desta forma, foram desenvolvidos e validados 2 métodos de quantificação dos metabólitos secundários encontrados no *Z. joazeiro* Mart., sendo eles: saponinas-taninos e saponinas. Paralelamente, pode-se determinar o conteúdo de taninos por uma proposta de quantificação indireta.

O métodos propostos foram validados seguindo as orientações da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) guidelines Q2(R1) e a RDC nº 166, publicada em 24 de julho de 2017.

4.2.3.1 Validação do método de quantificação de Saponinas- Taninos

As saponinas presentes no extrato foram quantificadas pelo ensaio colorimétrico vanilina- sulfúrica (SURESH et al.,2021). As reações ocorrem em um tubo de ensaio: utilizando 0,6 mL da solução hidroalcoólica de *Z. joazeiro* Mart., 100 µL de vanilina à 4%, previamente dissolvida em solução metanólica, e 2500 µL de ácido sulfúrico 64%. Posteriormente, os tubos foram homogeneizados e levados ao banho-maria à 60 °C por 20 minutos. Em seguida, o volume foi completado para 4 mL com solução hidroalcoólica 50 % (etanol:água) e realizada a leitura no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 460nm.

O mesmo preparo de amostra com as respectivas concentrações de vanilina e ácido sulfúrico foi utilizado para obtenção das reações com a solução padrão de diosgenina e o branco.

4.2.3.1.1 Seletividade

A avaliação do parâmetro da seletividade foi conduzida pelo método de varredura na região de 380 a 800 nm tanto do padrão de diosgenina na concentração de 2,0 µg/mL como do extrato hidroalcoólico **Lote 01** de 3,0 µg/mL, visando selecionar o comprimento de onda mais favorável ao desenvolvimento do método de quantificação e que seja identificado o sinal analítico característico das saponinas. A seletividade do método analítica será demonstrada por comparação entre os dados espectrais de varredura da substância química de referência e da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

4.2.3.1.2 Linearidade

A construção da curva analítica foi realizada com os valores de absorbância referentes a concentração de saponinas- taninos na região de 460 nm presente nas soluções do padrão de diosgenina e do extrato hidroalcoólico do *Z. joazeiro* Mart. em diferentes níveis de concentração com cada ponto determinado em triplicata.

Os cinco níveis de concentração para a construção da curva analítica do padrão de diosgenina foram 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 µg/mL e para os níveis para o extrato hidroalcoólico **Lote 01** foram 1,13; 2,15; 3,00; 3,80; 4,50; 5,71; e 6,09 µg/mL.

Os dados de linearidade foram avaliados utilizando o cálculo de regressão linear, realizado pelo método dos mínimos quadrados através do software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc.). Além disso, os parâmetros de coeficiente de determinação (r^2), intercepto do eixo Y e a distribuição resíduos também foram avaliados.

4.2.3.1.3 Efeito da Matriz

O parâmetro do efeito da matriz foi avaliado através da construção da curva analítica da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. fortificada com 2 µg/mL de diosgenina nos mesmos níveis de concentração utilizados para avaliação da linearidade da solução hidroalcoólica de *Z. joazeiro* Mart., sendo as determinações realizadas em triplicata. Os dados de absorbâncias foram utilizados para construção das curvas analíticas para avaliação do paralelismo das retas e dos coeficientes angulares.

4.2.3.1.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A determinação dos limites através dos parâmetros fornecidos pela curva analítica das amostras do extrato e do padrão foram calculados por meio das equações 1 e 2 para o LD e LQ, respectivamente (BRASIL, 2017).

$$LD = \frac{3,3 * \sigma}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 * \sigma}{IC} \quad (2)$$

Onde, IC trata-se da inclinação da curva analítica e σ refere-se ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y (BRASIL, 2017).

4.2.3.1.5 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

A avaliação do parâmetro da precisão foi realizado utilizando a solução hidroalcoólica de *Z. joazeiro* Mart. referente a concentração nominal de 3,00 µg/mL. Foram efetuadas 6 medições por dia, em três dias consecutivos, de amostras independentes, em um mesmo laboratório, referentes à avaliação dos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária.

Os dados foram expressos em conteúdo de saponinas-taninos em porcentagem, desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR). Posteriormente, os resultados foram avaliados estatisticamente pelo método t de *Student* com nível de significância de 0,05 (valor de *p*) para identificar possíveis variâncias entre o conteúdo de saponinas-taninos determinado em dias consecutivos.

4.2.3.1.6 Exatidão

O parâmetro da exatidão foi avaliado pela medição da porcentagem de recuperação dos resultados obtidos para construção da curva analítica da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. fortificada com 2 µg/mL da solução padrão de diosgenina. As amostras foram analisadas de forma independente em 3 níveis de concentrações (baixo, médio e alto) conduzidas em triplicata.

A concentração nominal de 3,0 µg/mL da curva analítica foi selecionada como o ponto médio (100%), o nível baixo com concentração de 2,15 µg/mL e 3,8 µg/mL como nível de concentração alto. As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre as concentrações de saponinas-taninos obtidas experimentalmente e as concentrações teóricas nas soluções hidroalcoólicas fortificadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e DPR. Além disso, as médias foram submetidos à análise estatística *t Student* para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes níveis de concentrações.

4.2.3.1.7 Robustez

No presente estudo, o parâmetro da robustez foi conduzido através da realização de pequenas mudanças deliberativas no volume das soluções de vanilina (90 e 110 µL) e ácido sulfúrico (2400 e 2600 µL) adicionados ao meio reacional. Os dados encontrados foram expressos em concentração e desvio padrão relativo.

4.2.4 Validação parcial do método de quantificação de saponinas- taninos: solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* LOTE 02, LOTE 03 e ADULTO.

O método colorimétrico proposto para quantificação de saponinas-taninos no extrato hidroalcoólico do *Z. joazeiro* Mart. foi validado como descrito anteriormente utilizando a solução hidroalcoólica obtida com o indivíduo jovem Lote 01. A partir disso, os dados da validação do método foram utilizados para análise dos Lote 02, 03 e Adulto, conduzindo uma validação parcial para confirmar a reprodutibilidade do método em amostra diferentes do *Z. joazeiro* Mart.

Seguindo as exigências preconizadas pela RDC nº 166 de 24 de Julho de 2017, a validação parcial de um método analítico deve apresentar pelo menos os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão. Assim, o presente estudou conduziu-se a validação parcial por meio da avaliação dos parâmetros da seletividade, linearidade, precisão e

exatidão utilizando as soluções hidroalcólicas do *Z. joazeiro* Mart. Lote 02, Lote 03 e indivíduo adulto.

4.2.4.1 Seletividade

A confirmação da ausência de interferentes na região de quantificação das saponinas- taninos foi conduzida por meio da avaliação do parâmetro da seletividade. As condições analíticas foram realizadas conforme descrito no item da seletividade da validação do método analítico.

4.2.4.2 Linearidade

Conforme reportado anteriormente, o parâmetro da linearidade avalia a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração do metabólito secundário. A Tabela 4 apresenta as respectivas concentrações utilizadas para construção da curva analítica das amostras de *Z. joazeiro* Mart. Lote 02, Lote 03 e adulto.

Tabela 4 – Níveis de concentrações utilizados para construção da curva analítica das amostras dos indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart.

	Níveis de Concentração (µg/mL)				
	1	2	3	4	5
Lote 02	1,60	1,97	2,30*	2,60	2,70
Lote 03	2,04	2,5	2,93*	3,4	3,8
Adulto	1,59	1,94	2,20*	2,53	2,80

* concentração nominal de saponinas-taninos, estabelecida como o 100%.

Cada ponto selecionado foi determinado em triplicata e com os valores de absorbância obtidos realizou-se a construção da curva analítica. Os resultados foram avaliados conforme estabelecido na legislação vigente brasileira e estatisticamente utilizando o ANOVA.

4.2.4.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

As análises foram conduzidas com a solução hidroalcólica na concentração nominal (100%) estabelecida por meio da avaliação do parâmetro da linearidade e construção da curva analítica dos Lotes 02 e 03, bem como para o indivíduo adulto. Foram realizadas 6 medições por dia, em 3 dias consecutivos, e os dados expressos em

concentração e desvio padrão relativo. Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio do ANOVA.

4.2.4.4 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir de 15 determinações que contemplam o intervalo linear do método analítico proposto. Em cada estágio de concentração da amostra, foi adicionado uma concentração referente a 2,0 µg/mL da solução padrão de diosgenina e realizada a reação colorimétrica. Seguindo a resolução vigente brasileira, selecionou-se a concentração nominal como nível médio e um ponto abaixo e outro acima para os respectivos níveis baixo e alto de concentração. Os dados da exatidão foram expressos pela porcentagem de recuperação da concentração conhecida de diosgenina adicionada à solução hidroalcoólica e o DPR.

4.2.5 Controle de qualidade: Correlação do teor de saponinas-taninos presente nos diferentes lotes de droga vegetal

A determinação do conteúdo de saponinas-taninos em miligrama por grama de droga vegetal (mg/g) procedeu de maneira semelhante ao parâmetro da precisão. Foram realizadas 6 medições por dia, em três dias consecutivos, das soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. do indivíduo jovem nos diferentes estágios de coleta e do indivíduo adulto. A equação da reta utilizada para quantificação do conteúdo de metabólitos secundários foi aquela determinada na validação do método analítico.

4.2.6 Desenvolvimento do método analítico para quantificação de saponinas totais

Como descrito anteriormente, o método colorimétrico vanilina-acidificada para quantificação de saponinas apresenta vasta aplicabilidade na quantificação de taninos. No presente estudo, objetivando a quantificação inoquívoca do conteúdo de saponinas realizou-se um tratamento prévio das soluções hidroalcoólicas. O método analítico para quantificação de saponinas foi validado semelhante ao método saponinas-taninos, utilizando a solução hidroalcoólica do Lote 01.

4.2.6.1 Formação do complexo tanino-proteína

A formação do complexo baseou-se na metodologia de Hagerman e Butler descrita por Mole e Waterman (1987).

Preparou-se uma solução estoque de 100 mL contendo a mesma proporção de tampão acetato 0,2M e cloreto de sódio 0,17M e adicionou 0,5 mL de albumina humana 20%. Posteriormente, o pH da solução estoque foi ajustado para 4,9 por se tratar do ponto isoelétrico da proteína.

Em um tubo de ensaio, adicionou o extrato e a solução previamente preparada contendo tampão acetato e albumina humana. As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 15 minutos em uma rotação de 2500 rpm. O sobrenadante coletado foi utilizado para desenvolver e validar o método de quantificação das saponinas totais.

4.2.6.2 Seleção e otimização das condições analíticas

Visando selecionar as melhores condições analíticas foram testadas duas variáveis para avaliar a efetividade da formação do complexo tanino- proteína: o volume da solução tampão contendo albumina e o volume de extrato empregado na reação.

Inicialmente o volume do extrato foi mantido fixo e variou-se o volume da solução tampão com a albumina em 5 níveis diferentes, na faixa de 800 a 1300 µL, realizando a leitura para obtenção da absorbância no espectrofotômetro UV-Vis, seguindo as condições analíticas descritas no método analítico validado. Após selecionado o melhor volume da solução tampão com base nos dados das absorbâncias obtidas, variou-se o volume do extrato em 6 níveis diferentes (800- 1300 µL) e realizou-se as leituras.

4.2.6.3 Preparação de amostras e padrão

A solução padrão de diosgenina para validação do método analítico foi preparada pesando 50 mg do padrão e diluindo para 50 mL de etanol em um balão volumétrico, obtendo uma solução de trabalho com concentração de 5 mg/mL. A solução hidroalcoólica de trabalho do *Z. joazeiro* Mart. referente ao Lote **01** (coletada após seis meses de cultivo) foi preparada partindo do sobrenadante obtido no processo de complexação taninos- proteínas. Retirou-se uma alíquota de 1 mL de sobrenadante e completou o volume para 10 mL em um balão volumétrico com etanol: água (50:50).

4.2.6.4 Validação do método analítico de quantificação de saponinas

4.2.6.4.1 Seletividade

O parâmetro de seletividade está intimamente relacionado com a confiabilidade do método analítico. O método de varredura foi aplicado, sendo realizado um scan na

região de 380 à 800 nm para identificar os sinais analíticos característicos de saponinas na solução padrão de diosgenina e solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

4.2.6.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do modelo de regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados para construção das curvas analíticas em triplicatas para solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. (0,88, 1,96, 2,34, 2,80, 3,0, 3,40 e 4,21 µg/mL de saponinas-taninos) no comprimento de onda de 460 nm. A faixa de trabalho e a curva analítica da solução padrão de diosgenina empregada na validação do método analítico de saponinas foi a mesma obtida na validação do método de quantificação de saponinas-taninos Lote 01. O ajuste dos dados ao modelo de regressão, a distribuição de resíduos, o coeficiente de correlação foram avaliados.

4.2.6.4.3 LD e LQ

O limite de detecção trata-se da menor quantidade do analito de interesse que pode ser detectada nas condições analíticas do método proposto. O limite de quantificação por sua vez corresponde a menor quantidade que pode ser quantificada de forma precisa (BRASIL, 2017). Os valores do limite de detecção e quantificação foram estimados utilizando os dados do desvio padrão do intercepto e inclinação da curva analítica obtidos no parâmetro da linearidade (Equações 1 e 2).

4.2.6.4.4 Precisão

Foram efetuadas 6 medições por dia, em 3 dias consecutivos, para avaliação da repetibilidade precisão intermediária, sendo as análises realizadas em três dias consecutivos, no mesmo laboratório. Os resultados foram expressos em DPR e o conjunto de dados avaliados pelo teste *t Student*, visando identificar a existência de variações estatisticamente significativas.

4.2.6.4.5 Efeito da Matriz

O parâmetro do efeito da matriz foi avaliado através da construção da curva analítica da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. fortificada com 2 µg/mL de diosgenina nos mesmos níveis de concentração utilizados para avaliação da linearidade, sendo as determinações realizadas em triplicata. As inclinações das curvas foram

comparadas estatisticamente para identificar possíveis diferenças, bem como o paralelismo das retas para evidenciar ausência de interferentes dos constituintes da matriz (BRASIL, 2017).

4.2.6.4.6 Exatidão

A avaliação do parâmetro da exatidão foi medida pela porcentagem de recuperação dos resultados obtidos para construção da curva analítica da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. fortificada com 2 µg/mL da solução padrão de diosgenina. Assumindo a concentração central da curva analítica de 2,8 µg/mL como o nível médio (100%), um nível baixo (81%) e um nível alto (118%). Os dados da exatidão foram expressos pela porcentagem de recuperação da concentração conhecida de diosgenina adicionada à solução hidroalcoólica e DPR. Além disso, os dados foram submetidos à análise estatística *t Student* para verificar se houve diferença estatisticamente significativa.

4.2.6.4.7 Robustez

O parâmetro de robustez é avaliado através da capacidade de resistência do método a mudanças deliberativas (BRASIL, 2017). No estudo em questão, a robustez foi determinada causando mudanças discretas no volume de vanilina (90 e 110 µL) e ácido sulfúrico (2400 e 2600 µL) adicionados no meio reacional. Os resultados foram expressos em conteúdo em porcentagem e DPR.

4.2.7 VALIDAÇÃO PARCIAL DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS TOTAIS: Solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02, LOTE 03 e ADULTO.

Assim como para o método de quantificação de saponinas- taninos, a quantificação de saponinas totais nos diferentes lotes do indivíduo jovem e adulto foi conduzida através da validação parcial do método analítico.

4.2.7.1 Seletividade

A avaliação do parâmetro da seletividade do método proposto foi conduzido conforme descrito no item “*Seletividade*” objetivando identificar ausência de interferências na faixa de quantificação selecionada para o método analítico.

4.2.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do modelo de regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados para construção das curvas analíticas em triplicatas as soluções hidroalcólicas do *Z. joazeiro* Mart. (concentrações descritas na Tabela 5), no comprimento de onda de 460 nm. O ajuste dos dados ao modelo de regressão, a distribuição de resíduos, o coeficiente de correlação foram avaliados.

Tabela 5 – Níveis de concentrações utilizados para construção da curva analítica do método saponinas das amostras dos indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart.

Níveis de Concentração (µg/mL)					
	1	2	3	4	5
Lote 02	1,69	2,07	2,43*	2,58	2,92
Lote 03	2,37	2,79	3,23*	3,70	4,12
Adulto	1,24	1,75	1,89*	2,16	2,35

* concentração nominal de saponinas, referente a 100%

4.2.7.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

Foram realizadas 6 medições por dia, em três dias consecutivos, da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. na concentração nominal, referente ao ponto central da curva analítica. Posteriormente, os dados obtidos foram expressos em concentração e DPR, bem como analisando pelo método estatístico ANOVA.

4.2.7.4 Exatidão

A avaliação da exatidão procedeu com a adição de 2,0 µg/ mL da solução do padrão de diosgenina nos cinco diferentes níveis de concentração da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. previamente estabelecido no parâmetro da linearidade. Os dados obtidos foram expressos em forma de porcentagem de recuperação da concentração do padrão adicionado e DPR.

4.2.7 Controle de qualidade do conteúdo de saponinas totais presentes no *Ziziphus joazeiro* Mart. e correlação entre os diferentes períodos de coleta.

O conteúdo de saponinas presentes nos indivíduos jovens dos diferentes intervalos de coleta (**Lote 01**, **Lote 02** e **Lote 03**) e do indivíduo adulto foi determinado de forma semelhante ao parâmetro da precisão da validação do método analítico. As soluções hidroalcoólicas foram analisados em 3 dias consecutivos e os valores de absorbância

transformados em concentração de saponinas em miligrama por grama de material vegetal (mg/g) utilizando a equação da reta ($y = 0,2004x + 0,0181$) obtida na avaliação do parâmetro da linearidade. Os dados das concentrações de saponinas (mg/g) presentes nos indivíduos jovens e adulto foram utilizados para correlacionar a concentração do metabólito secundário em função do crescimento do *Ziziphus joazeiro* Mart.

4.2.8 PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DE TANINOS PRESENTES NO *Z. joazeiro* Mart.

A determinação do conteúdo de taninos presentes no *Z. joazeiro* Mart. conduziu-se por quantificação indireta. Com o conhecimento da concentração de saponinas-taninos e saponinas em miligrama por grama de droga vegetal, pode-se inferir a concentração de taninos aplicando a Equação (3). A concentração de taninos encontrada foi referente às 18 medições realizadas em três dias consecutivos de análises.

$$[\text{Taninos}] = [\text{SaponinasTaninos}] - [\text{Saponinas Totais}] \quad (3)$$

4.2.9 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

Os extratos secos dos indivíduos jovens foram obtidos por nebulização em um *spray dryer* industrial modelo SD 5.0 (Labmaq do Brasil Ltda) contendo 20% (m/m) do dióxido de silício coloidal, calculado baseado nos dados encontrados na massa de resíduo seco. O *spray dryer* operou com bico injetor nº 5 apresentando 2,0 milímetro de diâmetro interno e fluxo de ar de 55 Litros/minuto. Controlou-se também a temperatura de entrada em 140 °C e a temperatura de saída em 68 °C, bem como a vazão do soprador 3,5 m³/min.

As amostras do produto tecnológico obtido foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados no dessecador, em sala de armazenamento propícia com temperatura ambiente controlada, devidamente protegidas da luz e umidade. O rendimento do processo de secagem foi determinado após a nebulização dos extratos hidroalcoólicos do *Z. joazeiro* Mart. nos diferentes estágios de crescimento e do indivíduo adulto. Os dados foram obtidos utilizando a Equação 4.

$$(4) \quad \text{Rendimento (\%)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

Onde:

m_1 massa do extrato seco obtido em gramas

m₂ massa teórica do extrato seco baseado no resíduo seco com adição do adjuvante.

4.2.9.1 *Quantificação do conteúdo de saponinas totais no extrato seco de Z. joazeiro Mart.*

A determinação do conteúdo de saponinas presentes nos extratos secos do *Z. joazeiro* Mart. LOTE01 foi realizada de forma semelhante as análises conduzidas com a solução hidroalcoólica. Pesou-se, aproximadamente, 250 mg do extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. e solubilizou em 25 mL de solução hidroalcoólica 50%. Em virtude da presença do dióxido de silício coloidal necessário durante o processo de secagem, as soluções foram filtradas utilizando filtro HEPA e posteriormente, utilizadas para realização da remoção de taninos e reação colorimétrica vanilina- acidificada.

4.2.9.1.1 Linearidade

A curva analítica da solução padrão de diosgenina utilizada na quantificação de saponinas em extrato seco foi a mesma utilizada na validação do método analítico para o extrato hidroalcoólico.

O parâmetro da linearidade do extrato seco proveniente do indivíduo jovem Lote 01 foi avaliado em 8 concentrações com determinações em triplicata. A faixa de trabalho de quantificação variou de 0,58 a 3,30 µg/mL. Posteriormente, o conjunto de dados obtidos foram avaliados seguindo as recomendações preconizadas pela RDC nº 166/2017.

4.2.9.1.2 Precisão

Foram realizadas 6 determinações por dia, em 2 dias consecutivos, de amostras independentes na concentração nominal, previamente selecionada no parâmetro da linearidade. Os resultados foram expressos em concentração e desvio padrão relativo, e em seguida submetidos a análise estatística visando identificar o nível de significância do conjunto de dados encontrados.

A Tabela 6 apresenta os níveis de concentração para avaliação do parâmetro da precisão para as amostras de indivíduo jovem do *Z. joazeiro* Mart. Os resultados obtidos passaram pelo mesmo tratamento de dados descritos anteriormente.

Tabela 6 – Níveis de concentrações utilizados para avaliação da precisão do método saponinas dos extratos secos dos indivíduos jovens do *Z. joazeiro* Mart.

Níveis de Concentração (µg/mL)	
Lote 01	0,69*
Lote 02	2,69*
Lote 03	1,90*

* concentração nominal de saponinas, referente a 100%

4.2.9.1.3 Determinação do conteúdo de saponinas em miligrama por grama de extrato seco

A determinação do conteúdo de saponinas procedeu conforme o parâmetro da precisão (repetibilidade e precisão intermediária). Utilizou-se a equação da reta $y=0,2007x+0,0182$ para obtenção da concentração de saponinas em miligrama por grama de extrato seco por aspersão do *Z. joazeiro* Mart., indivíduo jovem.

4.2.10 DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

4.2.10.1 Preparo da formulação base gel dentifrício e incorporação do extrato seco de *Z. joazeiro* Mart.

A formulação do gel dentifrício foi realizada no laboratório de Controle de Qualidade do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, com as respectivas matérias-primas e concentrações descritas na Tabela 7.

Tabela 7- Lista de substâncias e suas respectivas concentrações utilizadas no preparo do gel dentifrício.

Matéria-Prima	Porcentagem
Extrato Seco <i>Z. joazeiro</i>	2,5 %
Carboximetilcelulose	4%
Lauril Sulfato de Sódio	2%
Sacarina Sódica	0,1%
Glicerina	20%
Oléo Essencial Alecrim Pimenta	qsp
Água Purificada qsp	100 g

Inicialmente foram pesados os ingredientes isoladamente nas suas respectivas proporções. Durante o preparo do gel as misturas dos componentes da formulação foram divididas em duas fases, fase **A** e fase **B**.

O extrato seco de *Z. joazeiro* Mart. apresenta em sua composição o excipiente farmacêutico dióxido de silício coloidal, que possui como característica marcante a baixa solubilidade. Desta forma, preparou-se uma solução aquosa de *Z. joazeiro* Mart. à 2,5% e posteriormente realizou a filtração utilizando filtro de seringa PES com diâmetro de 25 mm e 0,45 µm de poro, visando remoção do excipiente.

O preparo da fase A ocorreu com auxílio de gral e pistilo, dispersando a carboximetilcelulose em glicerina e reservou. Já o preparo da fase B se deu com a solubilização da sacarina em água e posteriormente, adicionou o lauril sulfato de sódio sob agitação branda. A etapa subsequente foi verter o conteúdo da fase B sobre a fase A com agitação moderada e adicionar a solução aquosa filtrada do extrato seco de *Z. joazeiro* e completou-se o volume com água purificada.

Após o preparo da formulação gel dentífrico contendo *Z. joazeiro* Mart. foram realizados testes de controle de qualidade.

4.2.10.2 Controle de Qualidade

Os ensaios analíticos realizados para verificação das conformidades do gel dentífrico a base de *Z. joazeiro* Mart. foram avaliação das características organolépticas e determinação de pH, bem como avaliação da influência da temperatura e rotação. Os resultados obtidos são de caráter informativo para nortear o desenvolvimento da formulação, não apresentando valores de referência padronizados.

4.2.10.2.1 Determinação das características organolépticas

A avaliação das propriedades organolépticas do gel foi realizada através de observações visuais das características macroscópicas da formulação levando-se em consideração o aspecto, cor e odor.

4.2.10.2.2 Determinação de pH

O potenciômetro foi previamente calibrado com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Inicialmente, pesou-se 1 grama do gel dentífrico e diluiu em 10 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se as medições em triplicata.

4.2.10.2.3 Teste de Estresse Térmico

A fim de identificar de forma acelerada possíveis instabilidades da formulação, a amostra foi submetida a condições extremas de temperatura. Aproximadamente 5 g do

gel foi pesado e submetido a condições de aquecimento de 40, 50, 60 °C com tempo de permanência em cada temperatura de 30 minutos. Em cada uma das etapas de aquecimento realizou-se inspeção visual do gel dentifrício.

4.2.10.2.4 Determinação da resistência a centrifugação

O ensaio de determinação da resistência a centrifugação permite a obtenção de resultados auxiliares de triagem sobre a estabilidade do produto testado, em virtude da condição extrema de agitação empregada. Para a realização do teste, empregou-se 5 g do gel dentifrício, em triplicata e centrifugou-se a 3000 rpm por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da análise macroscópica, para a verificação da ocorrência de instabilidade física, como separação de fases ou cremeação.

4.2.10.2.5 Estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar possui como objetivo fornecer dados auxiliares de triagem que permitem otimização das características farmacotécnicas da preparação farmacêutica, bem como ajustes tecnológicos, sendo uma etapa importantíssima no desenvolvimento de novas formulações ou aprimoramento das existentes. O presente estudo realizou como ensaios preliminares de estabilidade os ciclos de aquecimento e resfriamento em temperaturas brandas, bem como avaliação em condições ambientais que simulam o armazenamento em prateleiras.

4.2.10.2.6 Ciclos de aquecimento e resfriamento

A formulação foi submetida a duas condições de temperatura, sendo elas: em estufa a 45 ± 2 °C e geladeira a 8 ± 2 °C. Em cada uma das temperaturas a amostra permaneceu por 24 horas, sendo realizados ciclos intercalados de aquecimento e resfriamento com duração total de 12 dias. Transcorridas às 24 horas na temperatura determinada, avaliou-se as características organolépticas.

4.2.10.2.7 Condições ambientais de temperatura

O gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* Mart. foi armazenado em condições de temperatura controlada a $25 \pm 0,5$ °C por 90 dias, a contar da data de manipulação da preparação farmacêutica. Foram previamente selecionados os tempos de 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para avaliação das características macroscópicas, afim de identificar possíveis alterações nas propriedades organolépticas e pH.

4.2.10.2.8 Determinação do conteúdo de saponinas presentes no gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* Mart.

Aproximadamente 2 g do gel dentifrício (0,75 mg de saponinas) foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 50 mL e dissolvido em ácido sulfúrico 0,1 N para obter uma concentração de 15 µg/mL de saponinas. Posteriormente, a amostra foi tratada para remoção dos taninos e realizada a reação colorimétrica. Foram realizadas 6 determinações por dia, em 2 dias consecutivos, e os resultados expressos em miligrama de saponinas por grama de gel.

5 RESULTADOS

A qualidade, segurança e eficácia dos fitomedicamentos e fitocosméticos estão intimamente relacionadas à padronização dos processos de obtenção dos extratos vegetais. A otimização do processo de extração de substâncias químicas em materiais vegetais sofre alterações em virtude das variações de inúmeros fatores, tais como a técnica de extração, os parâmetros que podem ser modificados e o tipo de solvente empregado (VASCONSELOS *et al.*, 2005; ZANNOU *et al.*, 2022).

Utilizou drogas vegetais produzidas e fornecidas pela Estação Experimental da FUNBITS com rastreabilidade nas informações da produção vegetal no que se refere a origem, manejo e tempo de produção vegetal no campo. Com a droga vegetal padronizada se selecionou a técnica de extração por maceração em função da adaptação tecnológica viável para o material vegetal do *Z. joazeiro* Mart., utilizando como solvente extrator uma solução hidroalcoólica 50% (etanol:água). A mistura de solventes empregada justifica-se pela influência da polaridade no processo de extração dos metabólitos secundários de interesse, em especial as saponinas que são encontrados em elevada concentração na espécie estudada (SANTOS *et al.*, 2011).

A Tabela 8 apresenta os dados referentes a caracterização físico- química dos extratos hidroalcoólicos do *Z. joazeiro* Mart..

Tabela 8 – Dados obtidos da caracterização físico- química do extrato hidroalcoólico do *Z. joazeiro* Mart.

	Lote 01	Lote 02	Lote 03	Adulto
pH	6,08	6,38	6,58	6,25
Densidade Relativa (g/mL) (n=3)	0,9346	0,9529	0,9504	0,9435
Resíduo Seco	1,8409	1,8261	1,8267	1,8475

A determinação da densidade relativa e do resíduo seco compreendem parâmetros importantíssimos para o processo de secagem do extratos hidroalcoólicos, fornecendo dados relacionados a massa das soluções extrativas vegetais.

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS- TANINOS POR UV-VIS: LOTE 01

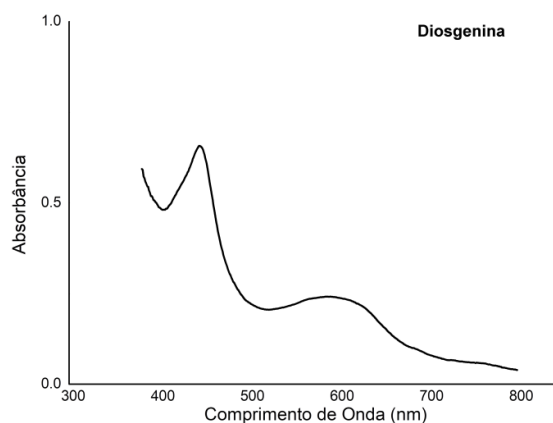
As análises dos compostos naturais presentes nos materiais vegetais representa uma grande dificuldade analítica por se tratar de matrizes complexas com uma infinidade de metabólitos secundários. Assim, faz-se necessário considerar a natureza da matriz e as características físico-químicas dos analitos de interesse para garantir a excelência do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos (SILVA; JORDAN- SINISTERRA; LANÇAS, 2018). Os métodos analíticos validados no presente estudo seguiram a RDC nº 166/2017 vigente no Brasil.

5.1.1 Seletividade

A avaliação da seletividade deve ser a primeira etapa a ser realizada no desenvolvimento do método, visto que esse parâmetro demonstra a capacidade do método analítico em determinar o analito de interesse na presença de impurezas ou outros constituintes da matriz (RIBANI *et al.*, 2014).

O presente estudo realizou a análise da seletividade utilizando o método espectrofotométrico de varredura que compreendeu do comprimento de onda de 380 nm a 800 nm. Os espectros referentes a varredura da solução do padrão de diosgenina e a solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 estão apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

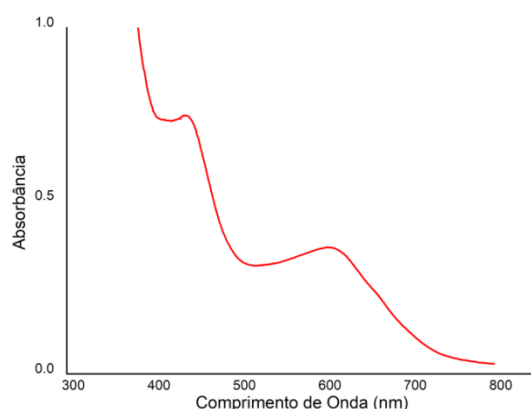
Figura 1 - Espectro UV- Vis da solução padrão de Diosgenina.



A RDC nº 166/2017 preconiza o uso de substâncias químicas de referência (SQR) na avaliação do parâmetro da seletividade com finalidade comparativa entre as respostas

analíticas geradas da SQR e do analito de interesse presente na amostra. Como demonstrado na Figura 5, o espectro da solução do padrão de diosgenina apresentou duas bandas de absorção. O primeiro deles com maior intensidade na região de 420 a 480 nm e o segundo entre 550 e 610 nm. Sinais analíticos semelhantes foram visualizados no espectro da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. (Figura 6).

Figura 2 - Espectro UV- Vis da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.



Não há na literatura uma padronização quanto o padrão e o comprimento de onda selecionado para a quantificação de saponinas utilizando o ensaio colorimétrico vanilina-sulfúrica. Segundo dados publicados, diversos fatores, tais como o solvente utilizado, o controle de temperatura e o tempo reacional interferem na intensidade da coloração desenvolvida e consequentemente, nos valores do conteúdo de saponinas encontrados (CHEOK *et al.*, 2014; SURESH *et al.*, 2021; LE *et al.*, 2018).

Desta forma, baseado nos dados obtidos por meio da varredura, foi selecionado o comprimento de onda de 460 nm para dar seguimento aos próximos parâmetros da validação do método espectrofotométrico, em virtude da maior intensidade do sinal analítico gerado.

5.1.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada utilizando-se da curva analítica construída com os valores da concentração da solução da SQR e da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. e seus respectivos valores de absorbância (Tabela 9 e Tabela 11, respectivamente).

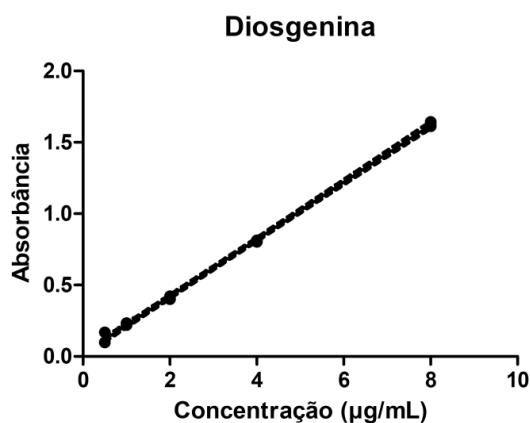
O método aplicado para encontrar o melhor ajuste do conjunto de dados foi a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Ao selecionar o modelo de regressão linear para explicar a variável resposta, alguns parâmetros estatísticos devem ser verificados, tais como a homocedasticidade e a normalidade de distribuição dos resíduos (MALAMAN; AMORIM, 2017).

Tabela 9 – Concentrações da SQR e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica do método de quantificação de saponinas-taninos.

Concentração de Diosgenina ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorbância
0,5	1	0,1694
	2	0,0984
	3	0,0978
1	1	0,2345
	2	0,2212
	3	0,2194
2	1	0,4182
	2	0,4001
	3	0,4218
4	1	0,8029
	2	0,8066
	3	0,8135
8	1	1,6265
	2	1,6435
	3	1,6128

A curva analítica da SQR utilizando os dados descritos na Tabela 9 está representada na Figura 7.

Figura 3 – Curva analítica da solução padrão de diosgenina.



Os dados de regressão obtidos para as 3 curvas analíticas com os diferentes níveis de concentração estão apresentados na Tabela 10.

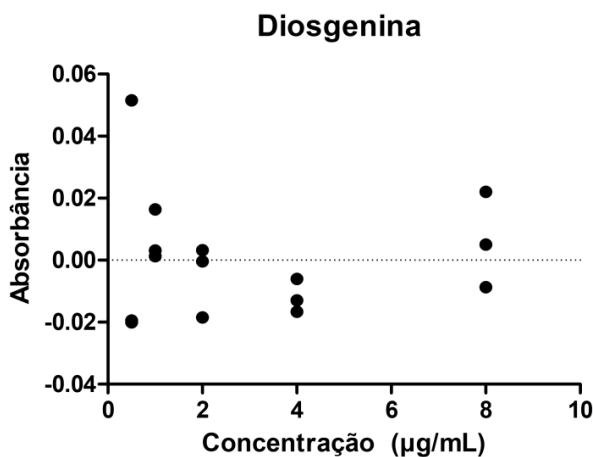
Tabela 10 - Equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) obtidos com a construção da curva analítica da SQR.

Curva Analítica	Equação da Reta	Coefficiente de Determinação
1	$y = 0,196x + 0,042$	0,9987
2	$y = 0,2048x - 0,0009$	0,9996
3	$y = 0,2004x + 0,012$	0,9998

O coeficiente de determinação explica o modelo de regressão linear aplicado, tendo em vista que os valores de r^2 variam de 0 a 1, quanto mais próximo de 1 maior será a capacidade de explicação, ou seja, melhor será o ajuste do modelo de regressão aplicado para o conjunto de dados avaliados (MALAMAN; AMORIM, 2017; CHEIN, 2019). Como apresentado na Tabela 10, os valores de r^2 para as três curvas de calibração da SQR estão acima de 0,99, demonstrando o bom ajuste do modelo.

Conforme relatado anteriormente, além do coeficiente de determinação, a distribuição de resíduos do modelo deve ser avaliada. A Figura 8 apresenta o gráfico de distribuição de resíduos do conjunto de dados da SQR.

Figura 4 – Gráfico de distribuição de resíduos baseado nos valores da curva analítica da SQR.



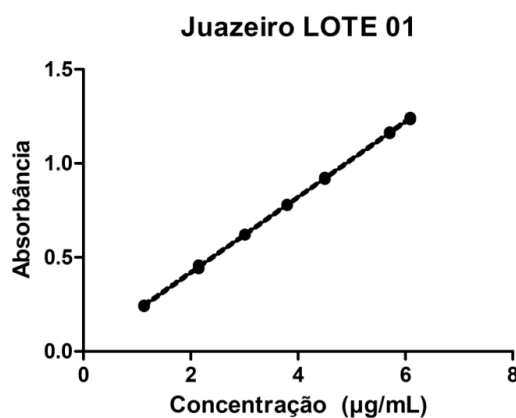
Os resíduos apresentaram-se de maneira aleatória, não tendenciosa, com a grande maioria dos pontos em torno de zero e ausência de pontos discrepantes, estando de acordo com o preconizado para caracterização de um bom ajuste do modelo (NUNES; NETO; FREITAS, 2019). A equação da reta da solução padrão de diosgenina utilizada para condução do parâmetro da linearidade para solução hidroalcolica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 01 foi reta $y = 0,2005x + 0,0176$.

A Tabela 11 reporta as concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 que compreende o intervalo de 1,13 a 6,09 $\mu\text{g/mL}$ e suas respectivas absorvâncias. A Figura 9 apresenta a representação gráfica da curva analítica contruída com os valores de absorvância nas respectivas concentrações.

Tabela 11 – Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorvâncias para construção da curva analítica do método de quantificação de saponinas-taninos.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorvância
1,13	1	0,2460
	2	0,2391
	3	0,2445
2,15	1	0,4589
	2	0,4401
	3	0,4504
3,01	1	0,6191
	2	0,6231
	3	0,6261
3,8	1	0,7774
	2	0,7781
	3	0,7821
4,5	1	0,9150
	2	0,9179
	3	0,9261
5,71	1	1,1625
	2	1,1598
	3	1,1665
6,09	1	1,2437
	2	1,2332
	3	1,2440

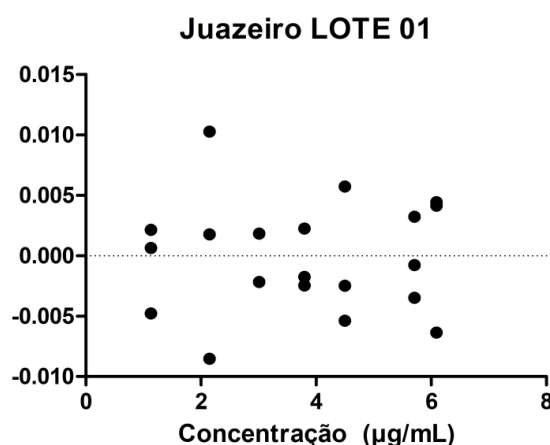
Figura 5 – Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro de linearidade da solução hidroalcoólica de *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.



O conjunto de dados avaliado pelo método dos mínimos quadrados apresentou um bom ajuste do modelo, além do coeficiente de determinação superior a 0,99. A curva

analítica obtida (Figura 9) com os valores de absorvância demonstrou que no intervalo de concentração de 1,13 a 6,09 $\mu\text{g/mL}$ a resposta analítica é diretamente proporcional ao teor do metabólito secundário presente na amostra. Desta forma, a equação da reta obtida foi $y = 0,2006x + 0,0175$. A distribuição de resíduos dos dados das leituras da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. apresentaram-se dentro da normalidade, de forma aleatória e não tendenciosa (Figura 10).

Figura 6– Gráfico de distribuição de resíduos baseado nos valores da curva analítica da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.



5.1.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

O parâmetro da precisão foi avaliado por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) dos teores obtidos nos três dias consecutivos de análises. A Tabela 12 mostra o conjunto de dados para avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

Tabela 12 – Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,9629	100,69	0,9241	96,56	0,9534	99,68
2	0,9736	101,83	0,9367	97,90	0,9625	100,65
3	0,9518	99,51	0,9143	95,52	0,9537	99,71
4	0,9846	103,00	0,9418	98,44	0,9499	99,31
5	0,9540	99,74	0,9534	99,68	0,9327	97,47
6	0,9821	102,73	0,9418	98,44	0,9606	100,44
	Média (n= 6)	101,25	Média (n= 6)	98,26	Média (n= 6)	99,54
	DPR	1,47	DPR	1,54	DPR	1,13
Média (n = 18) 98,28						
DPR = 1,55						

Segundo a RDC nº 166/2017, os critérios de aceitação do parâmetro da precisão estão baseados nas características do método proposto, bem como na concentração do analito de interesse e na complexidade da matriz. Os valores do teor de saponinas- taninos presente na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE01, nos 3 dias consecutivos de análises, estiveram entre 95 – 100% e o DPR foi de 1,55%.

A Instrução Normativa nº 4, de 18 de Junho de 2014, aponta que o coeficiente de variação aceito não pode ser superior a 15 % e o conjunto de dados deve ainda ser submetido a análise pelo teste t Student para comparação das médias obtidas. Os teores das 18 medições, referente aos 3 dias consecutivos de análises, foram analisadas e não apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo o valor do $t_{\text{calculado}}$ menor que o $t_{\text{crítico}}$ e $P > 0,050$.

Assim, o método colorimétrico proposto para quantificação de saponinas-taninos em solução hidroalcoólica apresentou boa precisão.

5.1.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

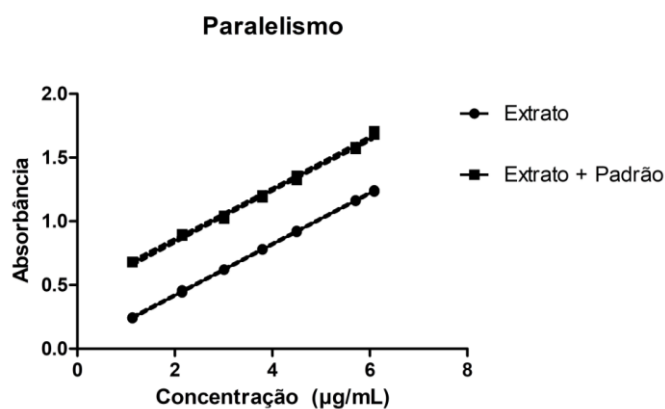
As concentrações referentes aos limites de detecção e quantificação foram determinadas baseando-se nos dados encontrados com a avaliação do parâmetro da linearidade, utilizando nas equações descritas pela RDC nº 166/2017. Desta forma, o método proposto possui como LD 0,20 µg/mL e LQ 0,62 µg/mL. Entretanto, trata-se de valores norteadores que devem ser verificados analiticamente para confirmação.

5.1.5 Efeito da Matriz

O efeito da matriz foi conduzido por meio da comparação das curvas de calibração obtidas de forma semelhante ao parâmetro da linearidade, com os mesmos níveis de concentrações e quantitativo de repetições. A primeira curva analítica foi a da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 e a segunda curva a da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. fortificada com 2 µg/mL da SQR.

A Figura 11 apresenta o paralelismo das retas das curvas de calibração da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 e da solução hidroalcoólica fortificada com SQR. O teste t Student foi aplicado para comparar as inclinações das curvas de calibração com significância estabelecida a 5%, ou seja, o valor de *P* maior que 0,05. Avaliando os valores de $t_{\text{calculado}}$ inferiores ao do $t_{\text{crítico}}$, pode-se inferir que as curvas são consideradas equivalentes, indicando que os efeitos da matriz complexa não interferem na quantificação do analito de interesse ($P = 0,72$) (LAVRA et al., 2008).

Figura 7– Representação gráfica das curvas de calibração para avaliação do efeito da matriz no método de quantificação de saponinas-taninos.



A proximidade entre os coeficientes angulares da solução hidroalcoólica e da mesma fortificada com o padrão, bem como o paralelismo das retas corroboram a ausência de influência da matriz complexa na detecção adequada e quantificação do analito de interesse, demonstrando a boa seletividade e especificidade do método analítico na faixa de trabalho selecionada (BERTOLDI et al., 2016).

5.1.6 Exatidão

Determinou-se o conteúdo de saponinas-taninos presentes na solução hidroalcoólica fortificada com a substância química de referência na concentração de 2

µg/mL. Os valores de recuperação para cada nível avaliado e o DPR estão expressos na Tabela 13.

Assim como para o parâmetro da precisão, os critérios de aceitação da exatidão variam conforme o analito de interesse e a matriz avaliada. As porcentagens de recuperação obtidas ficaram, aproximadamente, entre 100 e 105% e o DPR inferior a 1,5%.

Tabela 13 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível	Concentração	Concentração	Média	DPR
	%	Esperada	Recuperada	Recuperação	
		µg/mL	µg/mL	%	
Baixa	71,42	4,15	4,35	105,03	0,70
Média	100	5,01	5,07	101,21	1,14
Alta	126,24	5,80	5,87	101,23	0,71

A avaliação da normalidade dos dados proporciona uma descrição detalhada da amostra, sendo necessário levar em consideração o tamanho amostral para selecionar o método estatístico. Os valores de recuperação avaliados em triplicada para cada nível de concentração de solução do *Z. joazeiro* Mart. foram comparados estatisticamente e não demonstram diferença estatística, visto que o valor de P foi superior a 0,05 e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$. Pode-se inferir que o método espectrofotométrico proposto apresenta exatidão para quantificação de saponinas- taninos (MIOT, 2017).

5.1.7 Robustez

A avaliação do parâmetro da robustez foi desenvolvida com pequenas mudanças no volume de vanilina e ácido sulfúrico no meio reacional, visando avaliar a capacidade do método em resistir a mudanças deliberativas que podem ocorrer nas rotinas de análise. Por meio da avaliação da robustez, alguns pontos susceptíveis do método analítico podem ser identificados e dessa forma, realizada a monitorização criteriosa (LEITE, 2018). As Tabelas 14 e 15 apresentam os dados obtidos referentes as variações de vanilina e ácido sulfúrico, respectivamente.

Tabela 14- Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de valinina, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas- taninos.

	n	Absorbância	Teor %	Média DPR
90 µL (condição variável)	1	0,6130	98,62	97,91 1,53
	2	0,6253	100,66	
	3	0,6050	97,30	
	4	0,6032	97,00	
	5	0,6042	97,16	
	6	0,6016	96,73	
100 µL (condição variável)	1	0,6293	101,32	100,31 0,81
	2	0,6171	99,30	
	3	0,6228	100,24	
	4	0,6277	101,05	
	5	0,6181	99,46	
	6	0,6241	100,46	
110 µL (condição variável)	1	0,6383	102,81	100,74 1,92
	2	0,6071	97,64	
	3	0,6365	102,51	
	4	0,6182	99,48	
	5	0,6257	100,72	
	6	0,6289	101,25	

Avaliando os valores dos teores e os DPR referentes a variação da vanilina no meio reacional, pode-se inferir que o método mostrou-se bastante robusto para quantificação de saponinas- taninos por espectrofotometria na região do UV-Vis.

A Tabela 15 apresenta os valores de absorbâncias e teores encontrados com a modificação do volume de ácido sulfúrico no meio reacional.

Tabela 15- Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de ácido sulfúrico, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas- taninos.

	n	Absorbância	Teor %	Média DPR
2400 µL (condição variável)	1	0,6265	100,86	
	2	0,6028	96,93	
	3	0,6070	97,63	98,59
	4	0,6032	97,00	2,48
	5	0,6012	96,67	
	6	0,6362	102,46	
2500 µL (condição variável)	1	0,6193	99,66	
	2	0,6271	100,95	
	3	0,6128	98,59	99,75
	4	0,6277	101,05	1,32
	5	0,6081	97,81	
	6	0,6241	100,46	
2600 µL (condição variável)	1	0,6067	97,58	
	2	0,6237	100,39	
	3	0,6088	97,94	99,66
	4	0,6297	101,39	1,60
	5	0,6279	101,09	
	6	0,6189	99,60	

Dados reportados na literatura apontam cada vez mais a necessidade de um design experimental robusto, que são desenvolvidos durante a avaliação do parâmetro da robustez, para atender as exigências regulatórias devido as diversas alterações que podem vir a ocorrer durante o processo de fabricação de um produto, podendo estar associado ao próprio processo ou características do material analisado (GOETZ *et al.*, 2019; GOETZ *et al.*, 2021; EIFLER; SCHLEICH, 2021; STRICKER; LANZA, 2014).

5.2 VALIDAÇÃO PARCIAL DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS- TANINOS POR UV-VIS: LOTE 02, LOTE 03 e Adulto

A validação parcial do método analítico foi desenvolvida segundo preconizado pela RDC nº 166/2017, avaliando os parâmetros da seletividade, linearidade, precisão e exatidão das soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02, LOTE 03 e ADULTO.

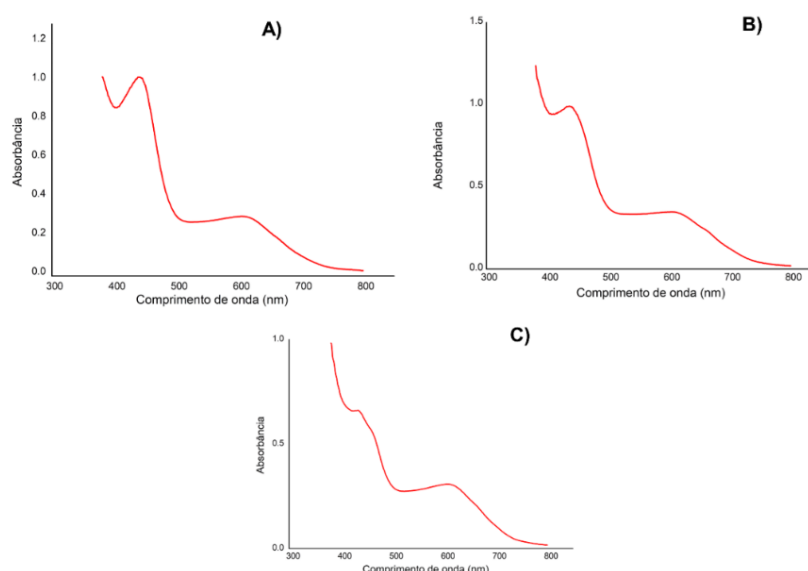
5.2.1 Seletividade

A Figura 12 apresenta o dado espectral referente a varredura no comprimento de onda de 380 a 800 nm para avaliação do parâmetro da seletividade. Pode-se observar que

os mesmos sinais analíticos característicos visualizados na solução da SQR e Na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 durante a validação do método analítico para quantificação de saponinas-taninos por espectrofotometria, também foram visualizados na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02, LOTE 03 e indivíduo ADULTO (Figura 12).

Conforme reportado anteriormente, o gráfico espectral da SQR foi utilizado com finalidade comparativa entre ele e o da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. visando identificar similaridades e divergências dos sinais analíticos. Como pode ser identificado na Figura 12, os espectros das soluções hidroalcoólicas dos indivíduos jovens e adulto apresentaram similaridade nos sinais analíticos gerados.

Figura 8- Espectro UV- Vis da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. o LOTE 02 (A), LOTE 03 (B) e Adulto (C).



Desta forma, pode-se inferir que o método analítico possui boa capacidade de identificação e quantificação das saponinas-taninos no comprimento de onda de 460 nm.

5.2.2 Linearidade

De acordo como método validado utilizando a solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01, a faixa trabalho para quantificação de saponinas- taninos na solução hidroalcoólica analisada compreende de 1,13 a 6,09 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta do método validado foi utilizada para quantificação dos metabólitos secundários presentes nos indivíduos jovens e adulto.

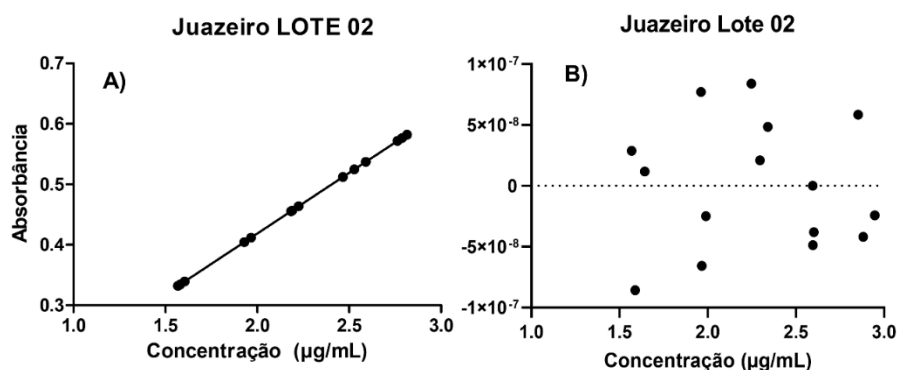
A RDC nº 166/2017 não preconiza a avaliação do parâmetro da linearidade nas validações parciais de métodos analíticos. Entretanto, neste estudo foi conduzido as análises de linearidade tanto dos indivíduos jovens (Lote 02 e Lote 03) como do indivíduo adulto, objetivando confirmar a janela de quantificação proposta e determinar as concentrações para avaliação dos demais parâmetros da precisão e exatidão. A Tabela 16 apresenta os valores de concentrações e suas respectivas absorbâncias para curva analítica do LOTE 02.

Tabela 16- Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> (µg/mL)	Replicata	Absorbância
1,60	1	0,3321
	2	0,3361
	3	0,3471
1,97	1	0,4110
	2	0,4165
	3	0,4119
2,29	1	0,4683
	2	0,4782
	3	0,4869
2,59	1	0,5394
	2	0,5382
	3	0,5380
2,89	1	0,5955
	2	0,6088
	3	0,5898

A Figura 13A demonstra a representação gráfica da curva analítica construída com o conjunto de dados apresentados na Tabela 16. Além disso, pode-se observar o gráfico de distribuição de resíduo (Figura 13B).

Figura 9– A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02. B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



O coeficiente de correlação para a curva analítica foi de 0,9980, comprovando-se a linearidade do método segundo RDC nº 166/2017. Encontrou-se uma regressão estatisticamente significativa, pois o F de significância obtido pela avaliação do ANOVA foi de 1.46143E-15, sendo menor que o nível de significância adotado ($\alpha = 0,05$). Os dados estatísticos corroboram para rejeição da hipótese nula (BRASIL, 2017; SANTOS; PINTO, 2017).

Tabela 17– Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de *Z. joazeiro* Mart. Lote 02.

Parâmetro avaliado	Resultados
Coeficiente de Determinação	0,9960
Coeficiente de Correlação	0,9980
F de significância	1.46143E-15
Número de Pontos	15

A inspeção visual do gráfico de dispersão de resíduos reportado na Figura 13 B) apontam para uma distribuição normal com dispersão muito próxima à reta traçada, demonstrando a independência dos resíduos (SILVA, 2017; JACOBI; SOUZA; PEREIRA, 2002). Após avaliação estatística criteriosa dos dados, pode-se inferir a relação de linearidade observada na faixa de concentração avaliada para a solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 02.

A Tabela 18 demonstra os valores de concentrações e as respectivas absorbâncias das análises da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 03 realizadas em triplicata para cada nível de concentração. Os dados obtidos foram analisados por meio de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

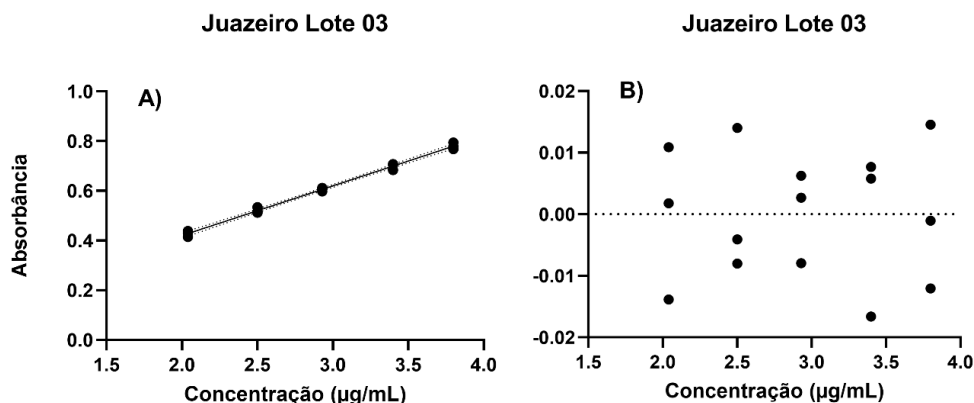
Tabela 18– Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> (µg/mL)	Replicata	Absorbância
2,04	1	0,4144
	2	0,4391
	3	0,4300
2,50	1	0,5161
	2	0,5121
	3	0,5342
2,93	1	0,5981
	2	0,6088
	3	0,6123
3,40	1	0,7058
	2	0,6834
	3	0,7077
3,80	1	0,7679
	2	0,7789
	3	0,7945

A Figura 14 **A**) apresenta a representação gráfica da curva analítica construída utilizando os valores descritos na Tabela 18. Por sua vez, a Figura 14 **B**) demonstra a distribuição de resíduos dos pontos avaliados pelo método dos mínimos quadrados.

O gráfico de dispersão de resíduos apresentado na Figura 14 **B**) foi plotado com as concentrações em função dos resíduos para avaliar a relação de linearidade entre a variável dependente e independente, a fim de identificar possíveis pontos atípicos (JACOBI; SOUZA; PEREIRA, 2002). Nota-se na faixa de concentração avaliada uma dispersão de resíduos de forma independente e não tendenciosa, indicando que não houveram alterações na linearidade e homoscedasticidade.

Figura 10 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



Os resultados foram avaliados também quanto as variáveis: coeficiente de determinação, coeficiente de correlação e os coeficientes lineares e angulares. Os coeficientes de determinação encontrados nas curvas analíticas determinadas em triplicata foram superiores a 0,99, estando de acordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2017).

Além disso, com a análise de variância (ANOVA) foi possível concluir que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 5%, demonstrando a boa linearidade na faixa avaliada (DEVENS;JUNIOR, SILVA, 2006).

Tabela 19– Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de *Z. joazeiro* Mart. Lote 03.

Parâmetro avaliado	Resultados
Coeficiente de Determinação	0,9939
Coeficiente de Correlação	0,9969
F de significância	1.12E-14
Número de Pontos	15

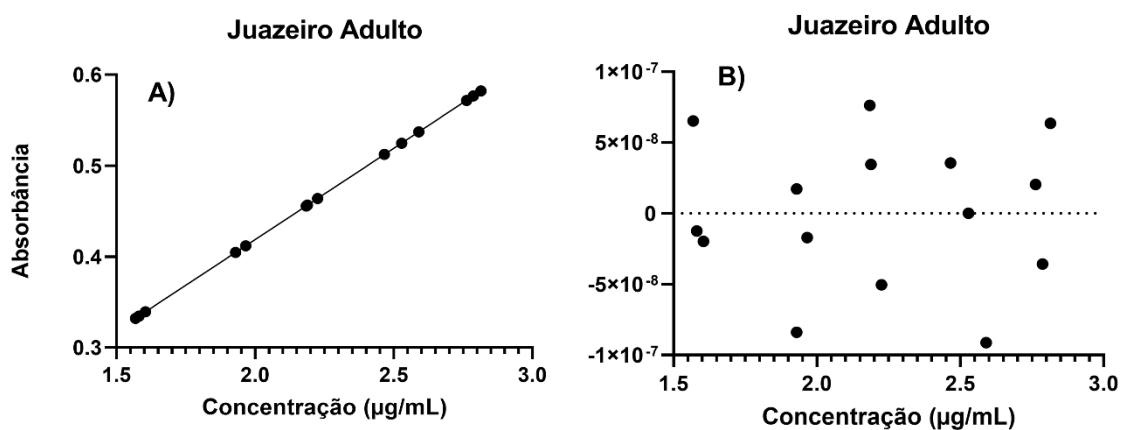
A avaliação da relação de linearidade com solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. indivíduo Adulto procedeu em uma faixa de quantificação entre 1,58 e 2,80 µg/mL, sendo as determinações realizadas em triplicata, obtendo 15 pontos de absorbância. Os valores dos dados referentes ao ensaio da linearidade estão reportados na Tabela 20.

Tabela 20 – Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorbância
1,59	1	0,3346
	2	0,3321
	3	0,3394
1,94	1	0,4045
	2	0,4119
	3	0,4046
2,20	1	0,4556
	2	0,4638
	3	0,4566
2,53	1	0,5123
	2	0,5371
	3	0,5371
2,8	1	0,5717
	2	0,5766
	3	0,5821

A Figura 17 A) e B) demonstra as representações gráficas da curva analítica e distribuição de resíduos.

Figura 11 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



Por meio da avaliação da distribuição de resíduos, pode-se observar o conjunto de pontos próximos a reta traçada no eixo X, referente a concentração do analito de interesse. Concluindo- se que há uma constância na variância do erro das variáveis analisadas.

Paralelamente, os dados foram avaliados pelo método ANOVA e os resultados estão expressos na Tabela 21. Encontrou- se um coeficiente de determinação e correlação superiores a 0,99, estando em conformidade com o preconizado pela legislação vigente e

As 6 determinações de *Z. joazeiro* Mart. Lote 02 na concentração nominal estabelecida através do parâmetro da linearidade, referente a avaliação da capacidade de repetibilidade do método, apresentaram uma média de concentração de 101,20% e DPR de 1,13%. O conteúdo de saponinas-taninos nas 18 determinações foi de 100,46% com um DPR inferior a 1,05%, comprovando que o método analítico proposto apresenta boa precisão intermediária. Dados semelhantes foram encontrados por Qu e colaboradores (2022) na quantificação de saponinas triterpênicas em frutos de *Panax notoginseng* por cromatografia líquida.

Além disso, as médias dos conteúdos de saponinas- taninos foram comparadas por meio do ANOVA, não sendo identificada diferença estatisticamente significativa dos pares (valor de $p = 0,073$).

A concentração nominal selecionada para condução da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária com solução hidroalcóolica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 03 foi de 2,93 µg/mL. Foram realizadas 18 determinações em 3 dias consecutivos e os dados estão reportados na Tabela 23.

Tabela 23– Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcóolica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,5915	97,65	0,5883	97,11	0,5871	96,91
2	0,5886	97,17	0,5954	98,32	0,5982	98,80
3	0,5906	97,51	0,5918	97,71	0,6123	101,20
4	0,5937	98,04	0,6024	99,51	0,5984	98,84
5	0,5925	97,83	0,6068	100,27	0,5981	98,79
6	0,5931	97,93	0,5923	97,79	0,6088	100,60
	Média (n= 6)	97,69	Média (n= 6)	98,45	Média (n= 6)	99,19
	DPR	0,32	DPR	1,22	DPR	1,54
Média (n = 18) 98,44						
DPR = 1,22						

Para a solução hidroalcóolica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 03, a média do conteúdo de saponinas- taninos nos três dias consecutivos de análises (n =18) foi de 98,44 e o DPR de 1,22%. Comparando as médias do conteúdo de saponinas- taninos referente aos três dias consecutivos de analises, encontrou-se um F menor que o valor de F crítico. Desta

forma, pode-se inferir que a variância das amostras referentes a avaliação do parâmetro da repetibilidade e precisão intermediária são semelhantes (GOMES *et al.*, 2021).

A avaliação da precisão do conteúdo de saponinas-taninos presentes na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO foi realizada em 3 dias consecutivos (n= 18) na concentração nominal referente ao 100% da faixa de trabalho estabelecida no parâmetro da linearidade (4,49 µg/mL). Os resultados das 18 medições foram expressos em teor e DPR, estando apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Valores de absorbância e teor das saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,4563	99,42	0,4568	99,54	0,4556	99,28
2	0,4632	100,99	0,4668	101,81	0,4638	101,13
3	0,4708	102,71	0,4506	98,13	0,4566	99,49
4	0,4578	99,78	0,4629	100,93	0,4662	101,68
5	0,4691	102,34	0,4586	99,95	0,4562	99,40
6	0,4634	101,04	0,4692	102,36	0,4647	101,34
	Média (n= 6)	101,05	Média (n= 6)	100,45	Média (n= 6)	100,39
	DPR	1,19	DPR	1,41	DPR	1,00
Média (n = 18) 100,63						
DPR = 1,25						

Os DPRs encontrados na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária apresentaram valores inferiores a 2,00%, sinalizando que não há grande variação entre as médias do conteúdo de saponinas-taninos na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Adulto (LIMA; NUNES; NETO, 2004).

Os conteúdos de saponinas-taninos das dezoito determinações foram comparados por análises estatística a nível de significância de 5%, obtendo um valor de *p* de 0,65 e valor de $F_{calculado} < F_{crítico}$, inferindo-se uma distribuição normal. Observando as avaliações do coeficiente de variação, bem como a análise estatística, conclui-se que o método possui boa repetibilidade e precisão intermediária.

A Tabela 25 reporta o compilado de informações dos resultados estatísticos do parâmetro da precisão para as análises das soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. dos indivíduos jovens e do indivíduo adulto.

Tabela 25- Resultados Estatísticos da avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart.

Amostra	<i>F</i> calculado	<i>F</i> crítico	valor de <i>p</i>
Lote 02	3,1225	3,6823	0,073
Lote 03	2,6081	3,6823	0,1066
Adulto	0,4387	3,6823	0,6528

Pode- se observar pelos resultados de *F* calculado maior que o *F* crítico, bem como o valores de *p* superiores a 0,05, que os resultados não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

5.2.4 Exatidão

O parâmetro da exatidão foi desenvolvido utilizando os mesmos níveis de concentração previamente estabelecidos para construção da curva analítica e posteriormente, adicionou-se na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. uma concentração de 2,0 µg/mL da SQR. As determinações para cada nível de concentração foram conduzidas em triplicata. As Tabelas 26, 27 e 28 apresentam os dados referentes aos níveis de concentrações empregados, a concentração esperada e recuperada, bem como as médias de recuperação e o DPR para a solução hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. Lote 02, Lote 03 e Adulto, respectivamente.

Tabela 26– Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02 para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível	Concentração	Concentração	Média	DPR
	%	Esperada	Recuperada	Recuperação	
		µg/mL	µg/mL	%	
Baixa	92,55	3,97	3,99 4,06 4,02	100,58 102,27 101,28	0,68
Média	100	4,29	4,38 4,39 4,41	102,23 102,33 102,89	0,27
Alta	107	4,59	4,54 4,62 4,63	105,84 100,70 101,04	2,29

Tabela 27– Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03 para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	Recuperação %	DPR
Baixa	85,32	4,5	4,59	102,14	0,65
			4,59	102,07	
			4,64	103,26	
Média	100	4,93	5,01	101,75	0,79
			5,08	103,19	
			5,02	101,83	
Alta	116,04	5,40	5,54	102,61	0,89
			5,45	101,04	
			5,53	102,65	

Tabela 28– Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. ADULTO para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	Média Recuperação %	DPR
Baixa	93,80	3,94	4,02	102,17	0,39
			4,05	102,98	
			4,02	102,09	
Média	100	4,20	4,26	101,59	0,86
			4,34	103,51	
			4,27	101,67	
Alta	107,85	4,53	4,58	101,07	0,66
			4,56	100,81	
			4,63	102,35	

Comprovou-se a exatidão do método analítico para quantificação de saponinas-taninos em soluções hidroalcoólicas por meio da avaliação da porcentagem de recuperação e os DPRs. Os dados obtidos demonstram uma boa porcentagem de recuperação para os três níveis de concentrações (baixo, médio e alto) exigidos pela legislação vigente com valores próximos a 100% (BRASIL,2017). Os baixos valores de DPR encontrados demonstram uma reduzida dispersão do conteúdo recuperado.

5.2.5 Controle de qualidade da droga vegetal e correlação do conteúdo de saponinas-taninos entre os indivíduos jovens e adulto

A determinação do conteúdo de saponinas-taninos em miligrama por grama (mg/g) do material vegetal foi conduzida de forma semelhante a avaliação do parâmetro da precisão das soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. referentes aos indivíduos jovens e o indivíduo adulto. As análises foram realizadas em 3 dias consecutivos com 6

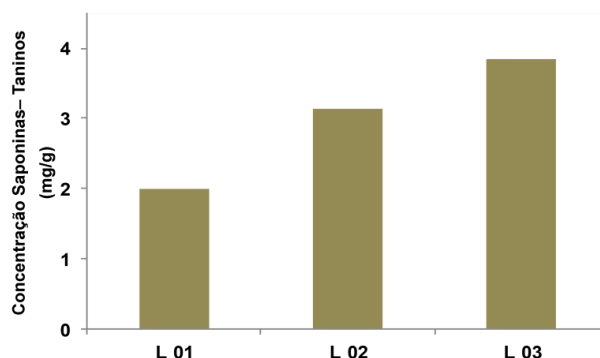
determinações da concentração nominal do *Z. joazeiro* Mart. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29– Conteúdo de saponinas- taninos em mg/g de material vegetal do *Z. joazeiro* Mart. referente aos indivíduos jovens e adulto.

SAPONINAS-TANINOS (mg/g)				
n amostral	LOTE 01	LOTE 02	LOTE 03	ADULTO
1	1,97	3,14	3,81	2,91
2	2,02	3,18	3,80	2,95
3	2,00	3,10	3,81	3,01
4	2,03	3,15	3,83	2,92
5	2,00	3,11	3,82	3,00
6	2,00	3,21	3,83	2,96
7	2,00	3,15	3,79	2,91
8	1,95	3,12	3,84	2,98
9	2,01	3,11	3,82	2,87
10	1,98	3,07	3,89	2,95
11	2,00	3,11	3,92	3,00
12	2,01	3,07	3,82	2,90
13	2,00	3,11	3,79	2,97
14	1,98	3,14	3,86	2,91
15	2,03	3,11	3,95	2,98
16	2,02	3,10	3,86	2,91
17	2,01	3,14	3,86	2,97
18	2,00	3,13	3,93	3,03
MÉDIA	2,00	3,13	3,85	3,01

A Figura 16 apresenta o gráfico do conteúdo de saponinas- taninos presentes nos indivíduos jovens, sendo possível visualizar um maior valor no indivíduo jovem coletado após dezoito meses de cultivo. Realizando um paralelo comparativo dos teores dos metabólitos secundários investigados, observa-se o conteúdo do indivíduo adulto semelhante ao do indivíduo jovem coletado após doze meses.

Figura 12 – Representação gráfica do conteúdo de saponinas-taninos nos diferentes estágios de crescimento.



A investigação sobre a produção de metabólitos secundários é de grande relevância para a padronização dos extratos de plantas medicinais. De acordo com levantamento realizado por Gobbo e Neto (2007), existem inúmeros fatores que alteram significativamente a taxa de produção dos metabólitos secundários, desde a idade e fase do desenvolvimento até o ciclo dia/noite.

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS POR UV-Vis

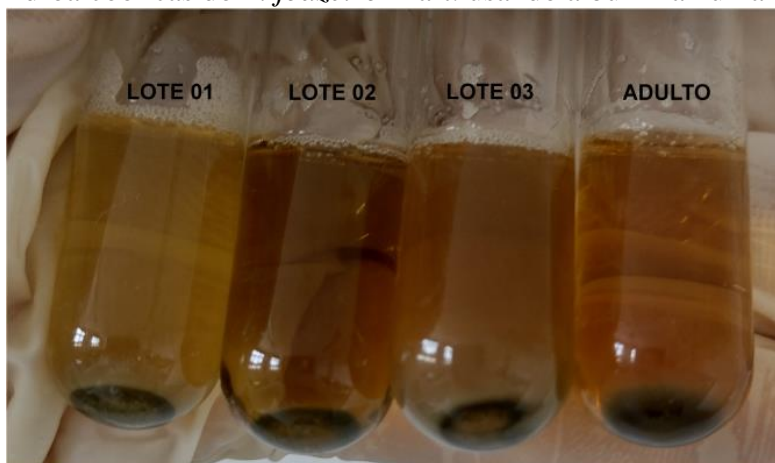
Como relatado anteriormente, a literatura aponta inúmeros estudos sobre a aplicação do método colorimétrico vanilina- acidificada para quantificação de taninos e saponinas. Assim, visando uma melhor padronização dos extratos hidroalcoólicos fez-se necessário realizar a remoção dos taninos presentes na solução hidroalcoólico do *Z. joazeiro* Mart. para que houvesse uma quantificação precisa e robusta do conteúdo de saponinas da droga vegetal.

Os taninos são compostos fenólicos de elevado peso molecular produzidos por meio do metabolismo secundário das plantas, estando intimamente relacionados aos mecanismos de defesa. Uma das mais descritas propriedades químicas dos taninos trata-se da capacidade de formação de complexos insolúveis em água com macromoléculas (proteínas e carboidratos), gelatinas e alcalóides (MONTEIRO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2008; OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007; MORAIS, 2019).

Seguindo a metodologia proposta por Hagerman e Butler (1978) e descrita por Mole e Waterman (1987), algumas adaptações foram realizadas para formação do complexo insolúvel dos taninos presentes na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. com albumina humana em pH 4,9. A Figura 17 aponta as capturas de imagens após a

formação do complexo tanino-proteína das soluções hidroalcolica do *Z. joazeiro* referente aos indivíduos jovens e adulto.

Figura 13- Captura imagem do processo de complexação de taninos –proteínas presentes nas soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. usando albumina humana.



FONTE: Autoria própria, 2023.

As capturas de imagens apresentadas na Figura 17 mostram que a formação do complexo tanino-proteína ocorreu de maneira intensa, sendo possível a visualização de forma macroscópica. Além disso, o sobrenadante demonstrou um aspecto límpido com ausência de sinais interferentes visíveis a olho nu. Entretanto, a formação da complexo sofre influência de inúmeros fatores associados as características tanto do metabólito secundário como da proteína. Entre os fatores de alta relevância estão o sítio de ligação, peso molecular, polaridade e o ponto isoelétrico da proteína (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007).

Buscando a melhor seleção das condições analíticas para desenvolvimento e validação do método de quantificação do conteúdo de saponinas, fez-se necessário investigar a influência das variações do volume de albumina humana e da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. durante o processo de formação do complexo.

5.3.1 Seleção e Otimização das condições analíticas

Inicialmente, investigou-se o melhor volume de albumina humana que deveria está presente no meio reacional. Para isso, utilizou-se um volume fixo da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE01 a 10% (1000 µL) e variou os valores de albumina humana. A Tabela 30 mostra os volumes de albumina utilizados para seleção

da melhor condição analítica e os respectivos valores de absorbância obtidos por meio da leitura da reação vanilina- acidificada realizada com o sobrenadante.

Tabela 30 – Volumes de albumina e as respectivas absorbâncias para seleção e otimização das condições analíticas do método de quantificação.

Albumina (μL)	Replicata	Absorbância
800	1	0,5829
	2	0,5804
	3	0,5807
1000	1	0,4003
	2	0,4145
	3	0,4005
1100	1	0,3792
	2	0,3975
	3	0,3925
1200	1	0,4151
	2	0,4267
	3	0,4187
1300	1	0,4949
	2	0,4931
	3	0,4946

Os volumes de albumina para realização do processo de complexação dos taninos com a proteína compreenderam de 800 a 1300 μL , sendo possível visualizar que os valores de absorbância decaem nos 3 pontos iniciais e posteriormente, voltam a subir. A partir disso, pode-se inferir que com o volume de 1100 μL da albumina humana houve o maior número de interações com as hidroxilas fenólicas dos taninos presentes na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. e consequentemente, restando no sobrenadante analisado apenas as saponinas disponíveis. O aumento do sinal da absorbância com o volume da albumina de 1200 μL sugere uma saturação dos sítios de ligações dos taninos com as proteínas, levando a um aumento desse no meio reacional.

Assim, o volume de 1100 μL da albumina humana foi selecionando para desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do conteúdo de saponinas presentes nas soluções hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

Após avaliação da influência do volume da albumina durante o processo de complexação, o volume de solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. foi variado em uma faixa que compreendeu de 800 a 1300 μL , mantendo fixo o volume de 1100 μL da albumina humana. A Tabela 31 mostra os resultados encontrados variando o volume da solução hidroalcoólica da droga vegetal.

Tabela 31 – Concentração de extrato e as respectivas absorbâncias do sobrenadante para avaliar o complexo tanino – proteína.

Extrato (μL)	Replicata	Absorbância
800	1	0,4679
	2	0,4426
	3	0,4464
900	1	0,4898
	2	0,4868
	3	0,4721
1000	1	0,4904
	2	0,4824
	3	0,4893
1100	1	0,4945
	2	0,4991
	3	0,4999
1200	1	0,5050
	2	0,5342
	3	0,5027
1300	1	0,5000
	2	0,5200
	3	0,5350

Analisando os dados demonstrados na Tabela 24 observa-se que os volumes de 900, 1000 e 1100 μL utilizados da solução hidroalcoólica apresentam, aproximadamente, os mesmos valores de absorbância. Logo, conclui-se que as interações realizadas entre taninos- proteínas são quantitativamente semelhantes. Portanto, o volume de solução hidroalcoólica selecionado para tratamento prévio a validação do método analítico de quantificação do conteúdo de saponinas presentes no *Z. joazeiro* Mart. foi de 1000 μL .

5.3.2 Validação Do Método Analítico Para Quantificação De Saponinas Por Uv-Vis: LOTE 01

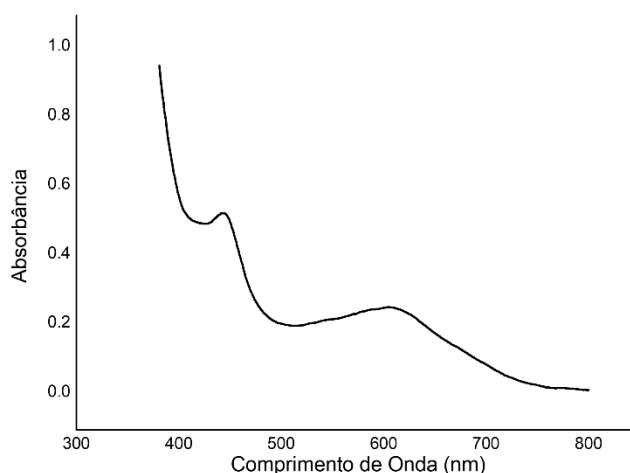
A validação do método analítico foi realizada utilizando o sobrenadante da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE01, seguindo as exigências preconizadas pela RDC nº 166/2017, atualmente vigente no Brasil. Os parâmetros avaliados foram a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito da matriz, precisão, exatidão e robustez. A substância química de referência utilizada foi o padrão Diosgenina, da Sigma. As condições analíticas, bem como os critérios de aceitação, foram idênticos ao método validado saponinas- taninos em solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

Vale salientar que a condução da validação do método para quantificação de saponinas por UV-Vis ocorreu utilizando como amostra o sobrenadante da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart.

5.3.2.1 Seletividade

O espectro de varredura do sobrenadante da solução hidroalcoólica do indivíduo jovem Lote 01 (Figura 18) após remoção dos taninos está apresentado na Figura 18. Os dados espectrais apresentaram dois sinais analíticos: o primeiro entre o comprimento de onda de 400 e 480 nm e o segundo entre 550- 650 nm, conforme visualizado no espectro da SQR.

Figura 14 – Espectro UV-Vis da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.



Pode-se observar no espectro de absorção que a remoção dos taninos presentes na solução hidroalcoólica causa uma redução visível na intensidade dos sinais analíticos gerados em virtude da remoção de taninos pelo processo de complexação com a albumina. Entretanto, a faixa de 420 a 480 nm permanece como a região de maior intensidade de absorbância gerada. Portanto, selecionou-se o comprimento de onda de 460 nm para quantificação de saponinas presentes no *Z. joazeiro* Mart.

5.3.2.2 Linearidade

Os dados da linearidade da SQR analisados na validação do método analítico para quantificação de saponinas-taninos foi utilizado também para a validação do método de quantificação do conteúdo de saponinas.

A faixa de concentração de trabalho da SQR compreende de 0,5 a 8,0 µg/mL, desta forma, as concentrações selecionadas para avaliação do parâmetro da linearidade com o sobrenadante solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 foram 0,88,

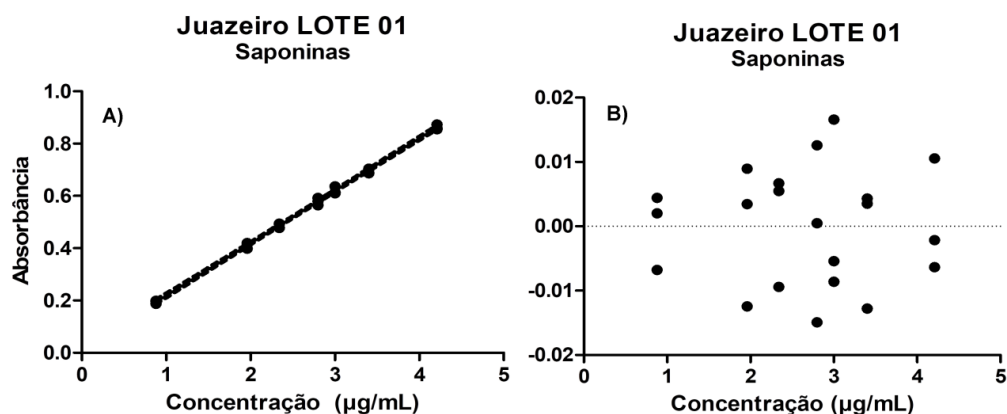
1,96, 2,34, 2,80, 3,0, 3,40 e 4,21 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados de absorvâncias para as respectivas concentrações estão descritos na Tabela 32.

Tabela 32 – Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorvâncias para construção da curva analítica.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorvância
0,88	1	0,1965
	2	0,1989
	3	0,1877
1,96	1	0,3985
	2	0,4199
	3	0,4144
2,34	1	0,4777
	2	0,4938
	3	0,4926
2,80	1	0,5644
	2	0,5919
	3	0,5798
3	1	0,6140
	2	0,6360
	3	0,6108
3,4	1	0,7039
	2	0,7031
	3	0,6868
4,21	1	0,8725
	2	0,8598
	3	0,8556

Os dados apresentados na Tabela 32 foram utilizados para construção da curva analítica e do gráfico de distribuição de resíduos demonstrados na Figura 19.

Figura 15 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* LOTE 01; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



O conjunto de dados obtidos foi avaliado por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, visando identificar o melhor ajuste do modelo analítico. O coeficiente de determinação (r^2) foi adequado, acima de 0,99, para a equação da reta $y = 0,2004x + 0,0181$. A distribuição de resíduos apresentou-se de forma aleatória e não tendenciosa, com os pontos próximos ao eixo zero e ausência de discrepância (Figura 19 B). Infere-se a boa relação de linear entre a concentração de saponinas presentes na solução hidroalcoólica e o sinal analítico gerado (BRASIL, 2017).

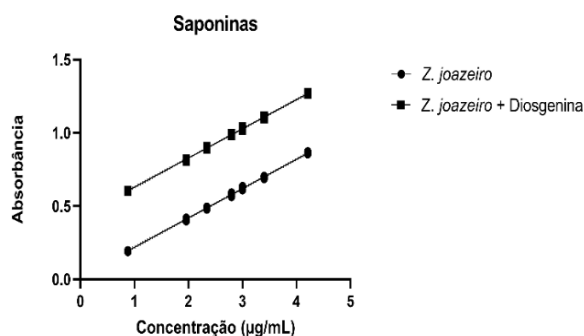
5.3.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados baseando-se nas equações propostas pela RDC nº 166/2017 que estima a utilização dos valores do coeficiente angular e coeficiente linear da equação da reta construída para avaliação da linearidade. Os valores de LD e LQ encontrados para a solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* LOTE 01 foram 0,09 e 0,28 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por meio disso, pode-se inferir que a menor concentração selecionada da faixa de trabalho (0,88 $\mu\text{g/mL}$) encontra-se acima do LD e LQ do método analítico proposto.

5.3.2.4 Efeito da Matriz

Os coeficientes angulares obtidos com a avaliação do parâmetro da linearidade foram utilizados para condução do efeito da matriz e os dados submetidos a análise estatística. A Figura 20 apresenta a representação gráfica do paralelismo das retas.

Figura 16 - Avaliação do efeito da matriz complexa usando o paralelismo das retas da solução hidroalcoólica de *Z. joazeiro* Mart. e da mesma fortificada com solução padrão de diosgenina.



Os coeficientes angulares da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. obtidos em triplicata foram 0,2039, 0,1983 e 0,1991 e para a solução fortificada foram 0,1950, 0,2008 e 0,2020, não havendo diferenças estatisticamente significativas quando avaliados pelo teste *t Student*, visto que o valor do *t* teste (*t calculado* = 0,3015) foi inferior ao valor esperado (*t crítico* = 4,3026). Desta forma, o paralelismo das retas foi determinado, confirmando não haver interferência da matriz complexa no método proposto (Figura 20).

5.3.2.5 Precisão

As determinações do conteúdo de saponinas foram conduzidas por amostras independentes do sobrenadante da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. em três dias consecutivos. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram uma boa porcentagem de recuperação com valores próximos a 100%, bem como um baixo desvio padrão relativo com valores inferiores a 2,5%. Pode-se inferir que o método analítico possui boa capacidade de quantificação em um curto espaço de tempo ao avaliar a repetibilidade e sob condições pontenciais ao avaliar a precisão intermediária (MADMON et al., 2023).

Tabela 33 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,5659	97,62	0,5501	94,81	0,5572	96,07
2	0,5876	101,49	0,5709	98,51	0,5684	98,07
3	0,5680	98,00	0,5734	98,96	0,5799	100,12
4	0,5600	96,57	0,5549	95,66	0,5765	99,51
5	0,5532	95,36	0,5586	96,32	0,5594	96,46
6	0,5819	100,47	0,5672	97,85	0,5689	98,10
	Média (n= 6)	98,25	Média (n= 6)	97,02	Média (n= 6)	98,06
	DPR	2,36	DPR	1,71	DPR	1,63
Média (n = 18) 97,78						
DPR = 1,90						

Os valores do teor de saponinas dos diferentes dias de análises foram submetidos a análise de variância objetivando identificar variações estatisticamente significativas. Os dados demonstraram um *F calculado* < *F crítico* e o valor de *p* superior a 0,05,

demonstrando não haver diferenças entre os conteúdos de sapopinas quantificados nos diferentes dias.

5.3.2.6 Exatidão

Conforme demonstrado na Tabela 34 às medições da exatidão apresentaram porcentagem de recuperação para os três níveis próximos a 100% e o DPR inferior a 1,5%. Aplicando o teste *t Student* observou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados, apresentando nível de confiança superior a 95%.

Tabela 34 – Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	Recuperação %	DPR %
Baixo	81	4,34	4,40	101,45	1,00
Médio	100	4,80	4,83	100,79	0,97
Alto	118	5,40	5,45	100,93	1,12

5.3.2.7 Robustez

A avaliação do parâmetro da robustez foi conduzida com pequenas mudanças deliberativas no volume de vanilina (90 e 110 µL) e ácido sulfúrico (2400 e 2600 µL) no meio reacional utilizando a concentração nominal da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01. A Tabela 35 mostra os dados de absorbância, teor e DPR obtidos quando realizada variação do volume de vanilina.

Tabela 35 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de valinina, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas.

	n	Absorbância	Teor %	Média DPR
90 µL (condição variável)	1	0,5830	100,67	99,01 2,43
	2	0,5753	99,30	
	3	0,5550	95,68	
	4	0,5932	102,49	
	5	0,5642	97,32	
	6	0,5716	98,64	
100 µL (condição nominal)	1	0,5893	101,79	100,70 1,34
	2	0,5871	101,40	
	3	0,5728	98,85	
	4	0,5877	101,51	
	5	0,5881	101,58	
	6	0,5741	99,08	
110 µL (condição variável)	1	0,5983	103,40	102,35 1,01
	2	0,5871	101,40	
	3	0,5965	103,07	
	4	0,5982	103,38	
	5	0,5857	101,15	
	6	0,5889	101,72	

Analisando os resultados apresentados na Tabela 35, pode-se observar que os valores do conteúdo de saponinas apresentaram-se na faixa de 98- 104%, havendo um único ponto com teor de 95%. Além disso, os DPR encontrados foram inferior a 2,5%, demonstrando que há baixa dispersão entre os dados encontrados.

A Tabela 36 apresenta os resultados encontrados ao variar o volume de ácido sulfúrico no meio reacional.

Tabela 36 - Resultados obtidos para seis experimentos, variando concentração de ácido sulfúrico, realizados para avaliação da robustez do método analítico para quantificação de saponinas.

	n	Absorbância	Teor %	Média DPR
2400 µL (condição variável)	1	0,5965	103,07	101,58 1,89
	2	0,5828	100,63	
	3	0,5987	103,47	
	4	0,5832	100,70	
	5	0,5712	98,57	
	6	0,5962	103,02	
2500 µL (condição nominal)	1	0,5893	101,79	100,70 1,34
	2	0,5871	101,40	
	3	0,5728	98,85	
	4	0,5877	101,51	
	5	0,5881	101,58	
	6	0,5741	99,08	
2600 µL (condição variável)	1	0,5867	101,33	100,01 1,61
	2	0,5637	97,23	
	3	0,5788	99,93	
	4	0,5897	101,86	
	5	0,5779	99,76	
	6	0,5789	99,94	

5.4 Validação Parcial do Método Analítico de quantificação de saponinas por UV-Vis: LOTE 02, LOTE 03 E ADULTO

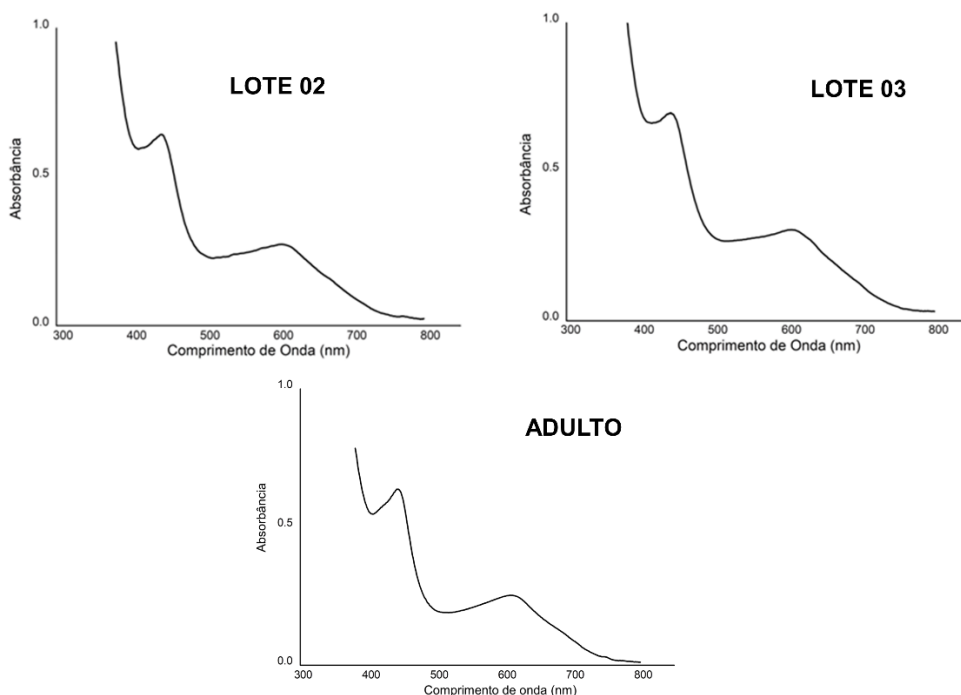
Assim como para a quantificação de saponinas-taninos nas soluções hidroalcólicas do *Z. joazeiro* Mart. foi realizado validação parcial do método, a quantificação de saponinas nos indivíduos jovens e adulto foi conduzida por meio da validação parcial avaliando os parâmetros da seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão.

5.4.1 Seletividade

A Figura 21 reporta os gráficos espectrais referente a varredura no comprimento de onda entre 380 e 800 nm das amostras do *Z. joazeiro* Mart. indivíduo jovem e indivíduo adulto.

Comparando os dados espectrais obtidos com as amostras citadas e o espectro de varredura da SQR, bem como do sobrenadante da solução hidroalcólica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 01, pode-se inferir através de uma inspeção visual a similaridade dos sinais analíticos gerados e ausência de interferentes no comprimento de onda selecionado para quantificação.

Figura 17 – Espectro UV-Vis da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02, LOTE 03 e Adulto.



5.4.2 Linearidade

Para a elaboração das equações da reta que explica a relação de linearidade entre a resposta analítica do equipamento e a concentração do analito de interesse, foi utilizado o modelo de regressão linear simples. Os cinco níveis de concentrações foram determinados em triplicata compreendendo o intervalo de concentração estabelecido na validação do método analítico proposto.

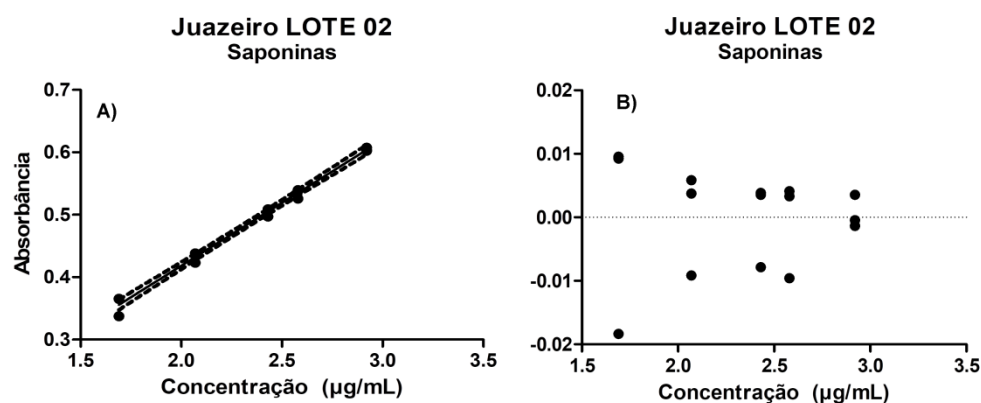
A Tabela 37 reporta as concentrações e respectivas absorvâncias da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. Lote 02 utilizados para construção da curva analítica.

Tabela 37 – Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração de <i>Z. joazeiro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorbância
1,69	1	0,3375
	2	0,3651
	3	0,3654
2,07	1	0,4233
	2	0,4383
	3	0,4362
2,43	1	0,4972
	2	0,5086
	3	0,5089
2,58	1	0,5394
	2	0,5386
	3	0,5257
2,92	1	0,6025
	2	0,6074
	3	0,6034

A Figura 22 mostra a representação gráfica da curva analítica obtida com os dados apresentados na Tabela 37 e o gráfico de distribuição de resíduos.

Figura 18 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



O método utilizado para analisar a relação entre as variáveis independentes e dependentes (concentração e resposta analítica, respectivamente) foi o modelo de regressão linear simples por meio do método dos mínimos quadrados ordinários que possui como objetivo utilizar técnicas matemáticas para otimizar o ajuste do modelo. O coeficiente de determinação encontrado foi adequado com base no preconizado pela legislação vigente, acima de 0,99 (BRASIL,2017). Além disso, observando a distribuição

de resíduos apresentada no gráfico exposto na Figura 22 B pode-se concluir uma distribuição aleatória, com os pontos próximos ao eixo central.

Assim, infere-se que o método analítico apresenta bom ajuste do modelo, havendo respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração de saponinas na faixa de trabalho de 1,69 a 2,92 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 38 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de *Z. joazeiro* Mart. Lote 02.

Parâmetro avaliado	Resultados
Coefficiente de Determinação	0,9949
Coefficiente de Correlação	0,9974
F de significância	3,72177E-15
Número de Pontos	15

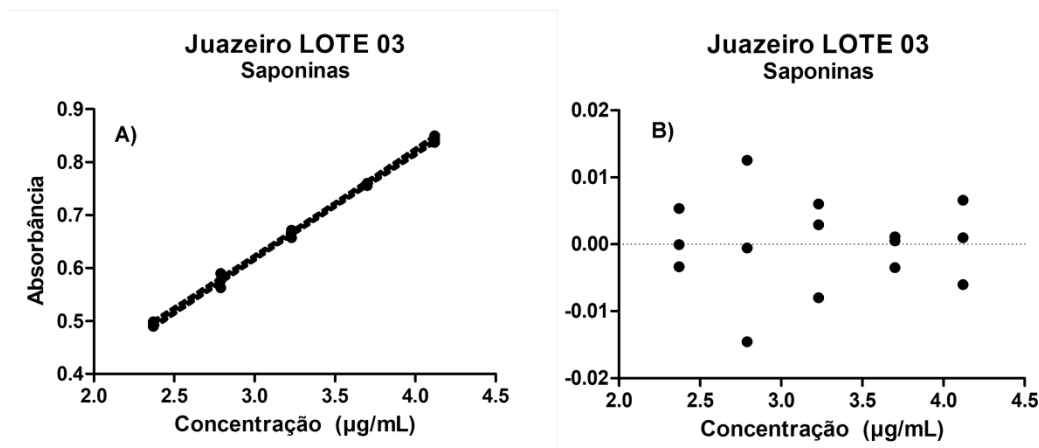
A linearidade foi analisada por meio da curva analítica construída com os valores de concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03 e seus respectivos valores de absorbância (Tabela 39). O método de regressão linear para avaliar o ajuste adequado do modelo foi o mínimos quadrados.

Tabela 39 – Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03 e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Replicata	Absorbância
2.37	1	0.4899
	2	0.4932
	3	0.4986
2.79	1	0.5767
	2	0.5898
	3	0.5627
3.23	1	0.6713
	2	0.6573
	3	0.6682
3.7	1	0.7604
	2	0.7558
	3	0.7598
4.12	1	0.8443
	2	0.8373
	3	0.8499

A curva analítica para a saponinas presentes na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03, construída com os dados da Tabela 39, está apresentada na Figura 23.

Figura 19 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



A equação da reta obtida foi $y = 0,2x + 0,0192$ com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9974 considerado adequado por estar acima de 0,99, como preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2017). Os resíduos (Figura 23 B) apresentaram distribuição normal, não havendo discrepância de pontos para as extremidades dos eixos.

Tabela 40 – Resultados do ANOVA para avaliação da regressão linear com amostras de *Z. joazeiro* Mart. Lote 03.

Parâmetro avaliado	Resultados
Coeficiente de Determinação	0,9970
Coeficiente de Correlação	0,9985
F de significância	1,6E-15
Número de Pontos	15

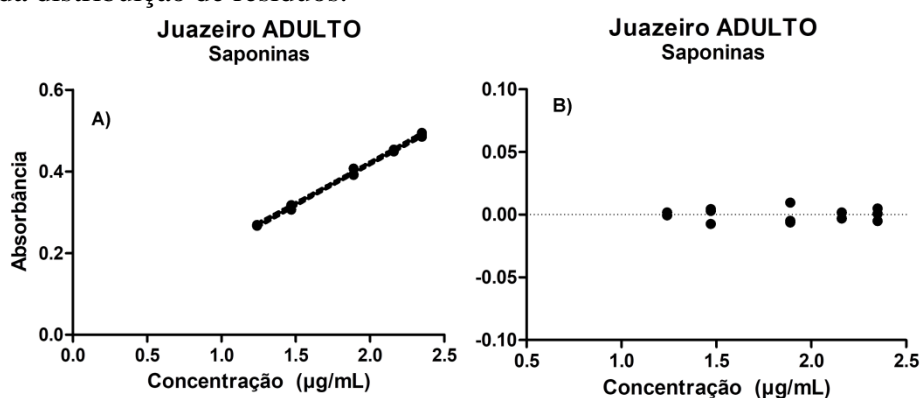
Os dados da linearidade referentes a solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO estão expressos na Tabela 41. As análises foram realizadas em triplicata para os cinco níveis de concentrações.

Tabela 41– Concentrações da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO e suas respectivas absorbâncias para construção da curva analítica.

Concentração µg/mL	Replicata	Absorbância
1.24	1	0.2671
	2	0.2668
	3	0.2691
1.47	1	0.3179
	2	0.3062
	3	0.3164
1.89	1	0.3928
	2	0.4074
	3	0.3915
2.16	1	0.4489
	2	0.4535
	3	0.4536
2.35	1	0.4908
	2	0.495
	3	0.485

A construção da curva analítica (Figura 24 A) foi realizada com os resultados apresentados na Tabela 41, além disso utilizou-se o conjunto de dados para avaliação da distribuição de resíduos.

Figura 20 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade da solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



Baseado nos requisitos estabelecidos pela RDC nº 166/2017, o método para quantificação de saponinas apresenta boa linearidade, sendo o coeficiente de determinação superior a 0,99 e a distribuição de resíduo aleatória e não tendenciosa.

Tabela 44 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,6520	97,96	0,6682	100,40	0,6613	99,36
2	0,6713	100,87	0,6573	0,9876	0,6773	101,78
3	0,6727	101,08	0,6599	99,15	0,6699	100,66
4	0,6645	99,84	0,6674	100,28	0,6705	100,75
5	0,6568	98,68	0,6874	103,30	0,6579	98,85
6	0,6557	0,9852	0,6637	99,72	0,6660	100,07
	Média (n= 6)	99,49	Média (n= 6)	100,27	Média (n= 6)	100,24
	DPR	1,31	DPR	1,61	DPR	1,04
Média (n = 18) 100,00						
DPR = 1,31						

Tabela 45 – Valores de absorbância e teor das saponinas na solução hidroalcoólica do *Z. joazeiro* Mart. ADULTO.

Amostra	Dia 01		Dia 02		Dia 03	
	Abs	Teor %	Abs	Teor %	Abs	Teor %
1	0,3895	98,17	0,3928	99,01	0,3892	98,10
2	0,3889	98,02	0,4074	102,71	0,4004	100,94
3	0,4025	101,47	0,3915	98,68	0,3965	99,95
4	0,3949	99,54	0,3938	99,26	0,3998	100,79
5	0,4066	102,51	0,3974	100,18	0,4024	101,45
6	0,3958	99,77	0,3915	98,68	0,4089	103,10
	Média (n= 6)	99,91	Média (n= 6)	99,75	Média (n= 6)	100,73
	DPR	1,78	DPR	1,55	DPR	1,64
Média (n = 18) 100,24						
DPR = 1,67						

A RDC nº 166/2017 preconiza que o desvio padrão relativo para avaliação da precisão deve apresentar critério de aceitação justificado pela concentração do analito de interesse, a matriz de amostra, bem como o método analítico proposto. Os indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart. apresentaram valores de DPR inferiores a 2%, tanto na condução da repetibilidade, como na precisão intermediária (BRASIL, 2017).

Os valores dos conteúdos de saponinas em porcentagem dos 3 dias consecutivos foram submetidos a análise de variância, a fim de identificar variações entre os conteúdos obtidos. A Tabela 46 apresenta os resultados da avaliação estatística.

Tabela 46 - Resultados Estatísticos da avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart.

Amostra	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>	valor de <i>p</i>
Lote 02	1,1311	3,6823	0,3493
Lote 03	0,6481	3,6823	0,5370
Adulto	0,5760	3,6823	0,5740

Os resultados estatísticos apontam para ausência de variância estatisticamente significativa, com valores de *F calculado* inferior a *F crítico*, bem como valor de $p > 0,05$. Inferindo- se um método preciso na faixa de trabalho selecionada.

5.4.4 Exatidão

As Tabelas 47, 48 e 49 reportam os valores de porcentagem de recuperação e o DPR das amostras de *Z. joazeiro* Mart., indivíduo jovem e adulto, nos diferentes níveis de concentrações preconizados pela legislação vigente brasileira.

Tabela 47— Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02 para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	Recuperação %	MÉDIA DPR
Baixo	85.18	2.57	2.55	99.23	101.01 1.53
			2.61	101.72	
			2.62	102.09	
Médio	100	2.93	2.98	101.72	102.54 0.92
			2.99	102.32	
			3.03	103.58	
Alto	120.16	3.42	3.51	102.76	103.00 0.31
			3.51	102.87	
			3.53	103.37	

Tabela 48 — Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03 para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	RECUPERAÇÃO %	Média DPR
Baixo	85	2.87	2.90	101.05	102,17 1,58
			2.91	101.45	
			2.98	104.02	
			3.39	103.30	
Médio	100	3.29	3.45	104.88	103,67
			3.38	102.84	1,02
			3.75	100.75	101,25 1,64
Alto	115.77	3.73	3.72	99.89	
			3.84	103.11	

Tabela 49— Porcentagem de recuperação e DPR do padrão adicionado a solução hidroalcoólica *Z. joazeiro* Mart. ADULTO para avaliação do parâmetro da exatidão.

	Nível %	Concentração Esperada µg/mL	Concentração Recuperada µg/mL	Recuperação %	MÉDIA DPR
Baixo	84.35	1.74	1.77	102.23	101.83 1.31
			1.79	102.92	
			1.74	100.34	
			2.10	106.96	
Médio	100	1.97	1.98	100.78	104.29
			2.07	105.11	3.04
			2.43	101.90	102.69 0.67
Alto	128.57	2.39	2.46	102.95	
			2.46	103.22	

Assim como para o parâmetro da precisão, o critério de aceitação da exatidão de um método analítico deve ser justificado baseando-se na concentração do analito de interesse, a matriz analisada e o nível de complexidade do método analítico que se deseja validar. Os extratos hidroalcoólicos representam uma matriz complexa em virtude da infinidade de metabólitos secundários presentes (BRASIL, 2017).

As determinações independentes do conteúdo de saponinas dos indivíduos jovens e adulto apresentaram média de porcentagem de recuperação, nos diferentes níveis, entre 101 e 104% e o DPR% inferiores a 5,00. Dessa forma, o método analítico espectrofotométrico demonstrou adequada exatidão para quantificação de saponinas em espécie de *Z. joazeiro* Mart.

5.4.5 Controle de qualidade da droga vegetal e correlação do conteúdo de saponinas entre os indivíduos jovens e adulto

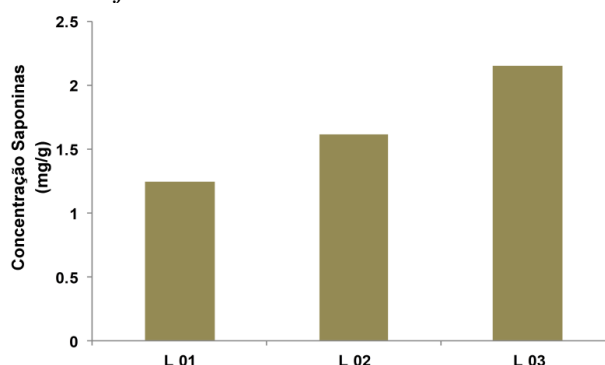
A determinação do conteúdo de saponinas em miligrama por grama de droga vegetal foi conduzida de forma semelhante ao parâmetro da precisão. As amostras independentes foram analisadas em três dias consecutivos e os resultados foram calculados utilizando a equação da reta proveniente da linearidade. Os resultados em mg de saponinas/ g de droga vegetal estão expressos na Tabela 50.

Tabela 50 - Conteúdo de saponinas em mg/g de material vegetal do *Z. joazeiro* Mart. referente aos indivíduos jovens e adulto.

n amostral	SAPONINAS (mg/g)			
	LOTE 01	LOTE 02	LOTE 03	ADULTO
1	1,24	1,60	2,17	1,24
2	1,26	1,61	2,18	1,23
3	1,28	1,59	2,15	1,28
4	1,24	1,62	2,12	1,25
5	1,27	1,62	2,12	1,29
6	1,26	1,63	2,11	1,26
7	1,24	1,62	2,13	1,25
8	1,27	1,61	2,13	1,29
9	1,22	1,65	2,16	1,24
10	1,26	1,62	2,16	1,25
11	1,25	1,63	2,23	1,26
12	1,27	1,59	2,15	1,24
13	1,24	1,59	2,14	1,23
14	1,26	1,63	2,19	1,27
15	1,24	1,63	2,17	1,26
16	1,27	1,64	2,17	1,27
17	1,24	1,63	2,13	1,28
18	1,26	1,62	2,16	1,30
MÉDIA	1,25	1,62	2,15	1,26

Pode-se observar que o conteúdo de saponinas aumenta em função do tempo, sendo a maior concentração visualizada após 18 meses de cultivo. Além disso, após o paralelo comparativo do conteúdo do marcador em indivíduos jovens e adultos, infere-se que o indivíduo adulto possui conteúdo de saponinas menor que o indivíduo jovem após 12 meses de cultivo (Figura 25).

Figura 21 - Representação gráfica da influência do tempo de cultivo no conteúdo de saponinas nos extratos de *Z. joazeiro* Mart.



Um estudo realizado por Vigo e colaboradores (2003) investigou a influência da sazonalidade e de três diferentes processos de secagem no conteúdo de saponinas das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng). Observou-se que o teor de saponinas apresentava maior quantidade nos períodos coletados no inverno se comparado com as demais estações. Além disso, constatou-se que o processo de secagem ao sol forneceu maior teor de extrativos e saponinas quando relacionado ao conteúdo identificado nos processos de secagem em estufa e na sombra.

Os indivíduos adultos, tanto casca como folha do *Z. joazeiro* Mart., apresentam conteúdo de saponinas significativo, sendo descrito na literatura a casca a parte de maior relevância e utilização, chegando a apresentar o dobro do teor equiparado com as partes aéreas (REGO, 2019; NASCIMENTO et al, 2020). Os valores encontrados no presente estudo apontaram que o conteúdo de saponinas dos indivíduos jovens após doze meses de cultivo foram superiores ao do indivíduo adulto, confirmando a alternativa vantajosa para preservação da espécie e realização de desenvolvimento tecnológico de maneira sustentável sem que haja perda da biodiversidade local. Dessa forma, conclui-se que o indivíduo jovem LOTE 03 representa uma alternativa vegetal satisfatória para ingrediente ativo farmacêutico.

5.5 QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO CONTEÚDO DE TANINOS PRESENTES NO *Ziziphus joazeiro* Mart. INDIVÍDUOS JOVENS E ADULTO

A capacidade de complexação de taninos com proteína possui ampla divulgação na literatura, representando uma estratégia analítica para quantificação de taninos, desde que a amostra seja submetida a um pré-tratamento com remoção dos interferentes.

Gomes e colaboradores (2021) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica rápida e robusta para quantificação simultânea de polifenóis e taninos em soluções hidroalcólicas de *Syzygium cumini* L. após a remoção de taninos utilizando caseína. A concentração de taninos totais foi determinada através da diferença entre o conteúdo de polifenóis totais e fenóis residuais (sobrenadante após precipitação de taninos com proteínas).

O presente estudo aplicou a mesma metodologia matemática para quantificação de taninos totais em amostras de solução hidroalcólica de *Z. joazeiro*. Os valores expressos nas Tabelas 29 e 50 representam a concentração de saponinas-taninos e saponinas totais em miligrama por grama de droga vegetal, aplicando-se a equação (4) obteve a concentração de taninos em mg/g de droga vegetal nos indivíduos jovens e adulto. Os resultados estão apresentados na Tabela 51.

Tabela 51- Concentração de taninos em mg/g de droga vegetal nos indivíduos jovens e adulto do *Z. joazeiro* Mart.

n amostral	TANINOS (mg/g)			
	LOTE 01	LOTE 02	LOTE 03	ADULTO
1	0,73	1,54	1,64	1,74
2	0,76	1,57	1,62	1,79
3	0,73	1,52	1,66	1,79
4	0,78	1,53	1,71	1,73
5	0,73	1,49	1,70	1,77
6	0,74	1,58	1,72	1,77
7	0,76	1,53	1,67	1,73
8	0,68	1,51	1,71	1,75
9	0,79	1,46	1,66	1,69
10	0,73	1,45	1,73	1,77
11	0,75	1,48	1,69	1,73
12	0,73	1,48	1,67	1,82
13	0,76	1,52	1,65	1,74
14	0,72	1,51	1,67	1,75
15	0,79	1,48	1,79	1,72
16	0,75	1,46	1,69	1,77
17	0,77	1,51	1,73	1,70
18	0,74	1,51	1,77	1,73
MÉDIA	0,75	1,51	1,69	1,75

Como pode ser observado, o conteúdo de taninos não apresenta diferença significativa entre os indivíduos jovens coletado após doze e dezoito meses de cultivo.

Espírito- Santo e colaboradores (1999) avaliaram a influência da sazonalidade, disponibilidade de água e sexo da planta na concentração de taninos em arbustos dioicos *Baccharis dracunculifolia*. Os pesquisadores identificaram um aumento na concentração de taninos nos meses de novembro a maio, característicos de verão. Entretanto, não conseguiram visualizar diferenças no conteúdo do metabólito frente ao sexo da planta e disponibilidade de água, sugerindo que fatores como fenologia e luminosidade pudessem afetar a produção de taninos pela espécie.

Monteiro e colaboradores (2005) avaliaram a correlação entre o conteúdo de taninos e altura e diâmetro de 3 plantas medicinais presentes no bioma Caatinga, não sendo confirmada a hipótese estudada. Porém, identificaram que a casca do caule em duas das três espécies estudadas apresentava maior concentração de taninos.

5.6 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS SECOS

O extrato seco representa uma excelente alternativa como insumo ativo farmacêutico para produção de fitocosméticos e fitoterápicos, em virtude da sua elevada estabilidade física, química e microbiológica, maior concentração dos metabólitos secundários e facilidade de adequação para inúmeras formas farmacêuticas. O presente estudo selecionou a técnica de secagem por aspersão em escala industrial por obter pós com maior uniformidade e granulometria homogênea (OLIVEIRA;PETROVICK, 2010; SOUZA, C et al. 2015).

A utilização do dióxido de silício coloidal como adjuvante farmacêutico no processo de secagem justifica-se pela capacidade de fornecer extratos secos com maior estabilidade e maiores rendimentos em virtude das suas propriedades físico- químicas. Um estudo realizado por Trindade e colaboradores (2020) avaliou a influência das variações de proporções entre o extrato seco de Muirapuama (*Ptychopetalum olacoides* Benth) e aerosil durante o processo de secagem, visualizando que o maior rendimento encontrado foram nas condições em que havia maior concentração do adjuvante farmacêutico.

O rendimento dos extratos secos dos indivíduos jovens e adulto apresentaram valores significativos entre 86 e 93%, em virtude da alta eficiência térmica e completa secagem fornecida nos secadores industriais. A literatura aponta que o processo de secagem, bem como o rendimento, são influenciados pela utilização de secadores de pequena escala, limitando- se a um rendimento de até 70% (AL-KHATTAWI et al., 2018).

5.6.1 Método analítico de quantificação de saponinas em extrato seco de *Z. joazeiro*

O método analítico para quantificação das saponinas presentes no extrato seco do *Z. joazeiro* Mart., indivíduos jovens e adulto, foi aplicado seguindo o método validado para quantificação de saponinas no extrato hidroalcóolica. Os ensaios realizados no método analítico foram a linearidade e construção da curva analítica para observar a proporcionalidade da resposta analítica na faixa de trabalho, bem como repetibilidade e precisão intermediária para identificar a capacidade do método em obter resposta precisas com variações de dias de análises.

5.6.1.2 Linearidade e Curva Analítica

A equação da reta da SQR foi utilizada para obter os valores de concentração de saponinas no sobrenadante do extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 52 .

Tabela 52 - Concentrações da solução do extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01 e suas respectivas absorvâncias para construção da curva analítica.

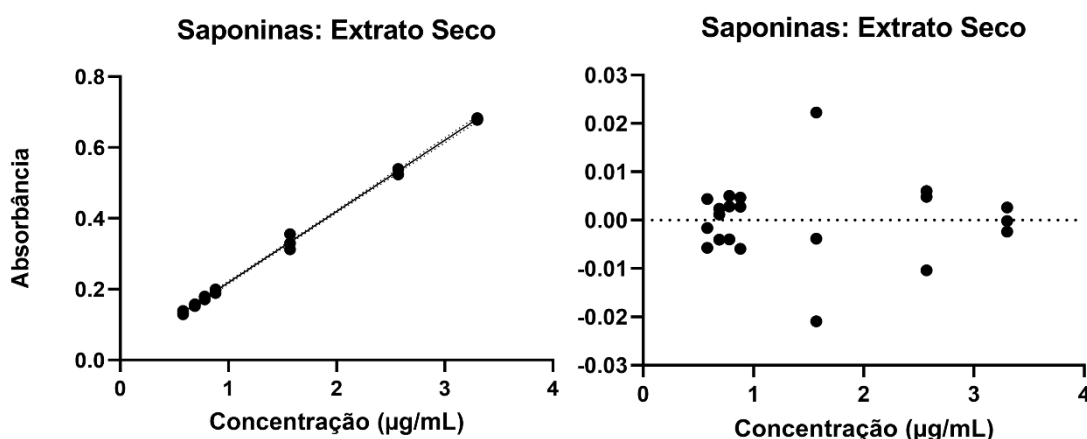
Concentração de <i>Z. joazeiro</i> (µg/mL)	Replicata	Absorvância
0.58	1	0,1288
	2	0,1329
	3	0,1389
0.69	1	0,1578
	2	0,1526
	3	0,1590
0.78	1	0,1775
	2	0,1707
	3	0,1797
0.88	1	0,1888
	2	0,1992
	3	0,1975
1.57	1	0,3123
	2	0,3555
	3	0,3294
2.57	1	0,5235
	2	0,5399
	3	0,5387
3.30	1	0,6780
	2	0,6802
	3	0,6830

Aplicando um ANOVA no conjunto de dados reportados na Tabela 52, pode-se observar o F de significância infinitamente inferior ao valor estabelecido. Além disso, os

coeficientes de determinação e correlação superior a 0,99 como preconizado na legislação brasileira (BRASIL, 2017).

Com os resultados estatístico demonstrando o bom ajuste do modelo de regressão linear, utilizou-se as concentrações da faixa de trabalho e as respectivas absorbâncias para construção da curva analítica reportada na Figura 26.

Figura 22 – A) Representação gráfica da curva analítica para avaliação do parâmetro da linearidade do extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01; B) Representação gráfica da distribuição de resíduos.



5.6.1.3 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

As Tabelas 53, 54 e 55 apresentam os valores de absorbância e os respectivos teores obtidos para avaliação do parâmetro da repetibilidade do método analítico.

Tabela 53 - Valores de absorbância e teor das saponinas no extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 01.

Amostra	DIA 1		DIA 2	
	ABS	TEOR %	ABS	TEOR %
1	0,1537	97,84	0,1526	97,05
2	0,1600	102,39	0,1536	97,77
3	0,1592	101,81	0,1561	99,57
4	0,1552	98,92	0,1514	96,18
5	0,1590	101,67	0,1506	95,60
6	0,1531	97,41	0,1526	97,05
	Média(n=6)	100,01	Média (n=12)	98,61
	DPR	2,20	DPR	2,31

Tabela 54 - Valores de absorvância e teor das saponinas no extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 02.

Amostra	DIA 1		DIA 2	
	ABS	TEOR %	ABS	TEOR %
1	0,5621	107,48	0,5565	106,44
2	0,5462	104,54	0,5480	104,87
3	0,5488	105,02	0,5507	105,37
4	0,5596	107,02	0,5610	107,28
5	0,5589	106,89	0,5468	104,65
6	0,5646	107,94	0,5435	104,04
	Média(n=6)	106,48	Média (n=12)	105,96
	DPR	1,29	DPR	1,25

Tabela 55- Valores de absorvância e teor das saponinas no extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. LOTE 03.

Amostra	DIA 1		DIA 2	
	ABS	TEOR %	ABS	TEOR %
1	0,3821	96,96	0,3958	100,61
2	0,3928	99,81	0,4055	103,19
3	0,3822	96,98	0,3870	98,26
4	0,3812	96,72	0,3982	101,24
5	0,3944	100,23	0,4044	103,78
6	0,3867	98,18	0,3921	99,62
	Média(n=6)	98,15	Média (n=12)	101,12
	DPR	1,57	DPR	2,07

Os dados reportados nas tabelas acima apontam a precisa capacidade do método analítico para determinação do conteúdo de saponinas em extrato seco. Visualizando-se valores de desvio padrão relativo inferiores da 2,5%.

5.6.1.4 Determinação do conteúdo de saponinas no extrato seco do *Z. joazeiro* : indivíduo jovem e adulto

A determinação do conteúdo de saponinas nas amostras de extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. foi conduzidas de forma semelhantes ao parâmetro da precisão, realizando dezoito medições em três dias consecutivos. A equação da reta $y=0,2007x+0,0182$ proveniente da validação parcial foi utilizada para quantificação do metabólito de

interesse. A Tabela 56 apresenta os valores de saponinas em miligrama por grama de extrato seco.

Tabela 56 - Concentração de saponinas em mg/g de extrato seco nos diferentes lotes do *Z. joazeiro* Mart.

n amostral	Lote 01	Lote 02	Lote 03
	[Saponinas mg/g]	[Saponinas mg/g]	[Saponinas mg/g]
1	4,50	9,63	15,10
2	4,70	9,37	15,53
3	4,68	9,41	15,61
4	4,55	9,59	15,30
5	4,67	9,58	15,67
6	4,48	9,67	16,08

Analisando os dados apresentados na Tabela 57, pode-se observar que a concentração de saponinas em miligrama por grama de extrato seco aumenta em função do tempo de cultivo do *Z. joazeiro* Mart., comportamento idêntico ao observado na quantificação do marcador no extrato hidroalcolico. Além disso, nota-se que houve uma concentração da solução, acarretando no aumento do conteúdo de saponinas, tal fato explica-se pelo processo de secagem por aspersão.

O uso de extrato seco como ingrediente ativo farmacêutico na produção de medicamentos e cosméticos desperta grande interesse nos centros de pesquisa e indústrias. Ribeiro e colaboradores (2022) desenvolveram um estudo com extrato seco de *Passiflora nitida* Kunth objetivando realizar a caracterização físico-química e aplicação em formulações cosméticas. Os autores propõem parâmetros para realização do controle de qualidade que atendessem os parâmetros farmacopeicos.

O mapeamento do conteúdo de saponinas nos extratos secos do *Z. joazeiro* Mart., indivíduo jovem e adulto, representa uma grande estratégia tecnológica para obtenção de ingrediente ativo farmacêutico proveniente de droga vegetal, garantido que o conteúdo do marcador majoritário de interesse apresenta-se na concentração desejada para desenvolvimento de fitomedicamentos e fitocosméticos.

5.7 DESENVOLVIMENTO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

Inúmeros estudos reportados na literatura apresentam as saponinas como marcador majoritário presente no *Ziziphus joazeiro* Mart., sendo amplamente utilizada na

medicina popular para confecção de produtos de higiene pessoal em virtude das suas propriedades. Baseado nos dados preliminares da concentração das saponinas nos diferentes lotes de *Z. joazeiro* Mart. cultivados no município de Serra Branca, foi proposta uma preparação farmacêutica com finalidade dentifrício.

O ingrediente ativo farmacêutico previamente selecionado para incorporação no gel dentifrício foi o extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. obtido do material vegetal após dezoito meses de cultivo (Lote 03), dado o maior conteúdo de saponinas presente quando comparado ao Lote 01 e Lote 02.

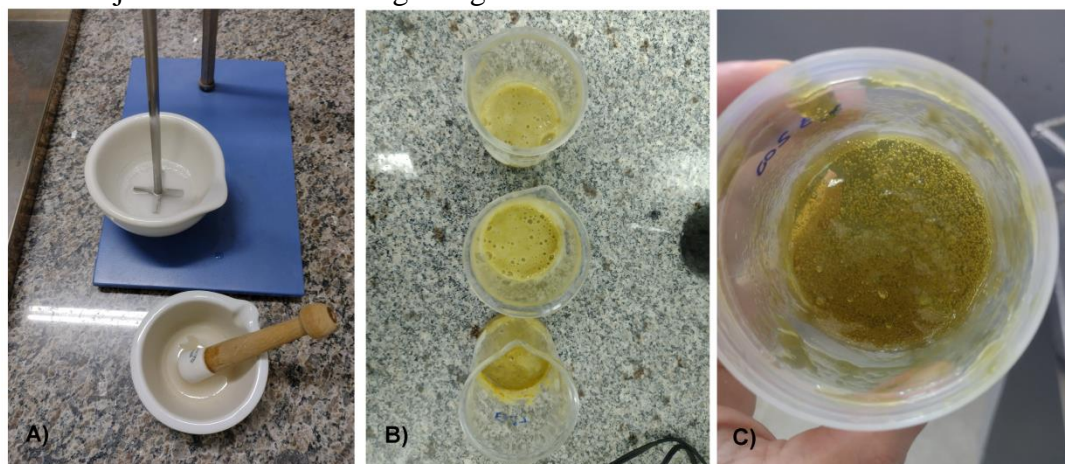
5.7.1 Desenvolvimento do gel dentifrício e controle de qualidade da preparação farmacêutica

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações compostas por substâncias de origem natural ou sintética, para uso externo, destinadas a proteger ou manter o bom estado das diversas partes do corpo (BRASIL, 2015). Segundo a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, os géis são preparações semissólidas que possuem um adjuvante farmacêutico denominado de agente geleificante responsável por conferir firmeza a uma solução ou dispersão coloidal (BRASIL, 2019).

O gel dentifrício desenvolvido no presente estudo apresentou como agente geleificante um polímero derivado de celulose, a carboximetilcelulose, conferindo a formulação a característica de gel hidrofílico (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Com base no formulário nacional da farmacopeia brasileira, a concentração ideal do derivado de celulose, a carboximetilcelulose, seria de 2%. Entretanto, observou-se alta fluidez da preparação sendo necessário utilizar 4% do agente geleificante para melhoria das propriedades tecnológicas.

A Figura 27 apresenta as capturas de imagens obtidas durante o processo de desenvolvimento e otimização da preparação farmacêutica, pode-se observar que na Figura 27 **B** o gel por possuir menor concentração do agente geleificante demonstra em suas características macroscópicas um aspecto de maior fluidez com presença de bolhas. Desta forma, o aumento da concentração da carboximetilcelulose para 4% (Figura 27 **C**) justifica-se para obter otimização na apresentação do gel.

Figura 23 - Captura de imagens da preparação do gel dentifrício a base de *Z. joazeiro*. A) Gel base ; B) Gel a base de *Z. joazeiro* Mart. com 2% de agente geleificante; C) Gel a base de *Z. joazeiro* com 4% de agente geleificante.



FONTE: AUTORIA PRÓPRIA, 2022.

Paralelamente, vale salientar que a formulação descrita na literatura apresenta como conservante o propilparabeno da classe dos parabenos, extensamente utilizado em preparações cosméticas por seu espectro ampliado de atuação e baixo custo. Visando obter uma formulação com menor quantidade de compostos sintéticos e tendo em vista a potencial atividade antimicrobiana e antioxidante do *Z. joazeiro* Mart., o propilparabeno foi retirado da formulação. Entretanto, tal modificação representa uma proposta inovadora, sendo necessário estudos complementares de estabilidade de longa duração e crescimento microbiano antes da comercialização (FERNANDES et al., 2013; GONÇALVES; NAGATA; PERALTA-ZAMORA, 2020; ANDRADE et al., 2019a; ANDRADE et al., 2019b; SILVA et al., 2022; RIBEIRO et al., 2013).

Após um levantamento realizado na literatura não foi possível identificar nenhum trabalho que apresentasse a concentração de saponinas presente em preparações farmacêuticas com finalidade de higienização bucal. Contudo, um estudo realizado por Caetano (2014) apontou a incorporação de até 5% de extrato seco em preparação de gel dentifrício.

O estudo de pré-formulação conduzido para identificar a concentração ideal de *Z. joazeiro* Mart. para incorporar no gel dentifrício foi realizado avaliando as características macroscópicas da preparação. As concentrações de 2,5 e 5,0% foram testadas e observou-se que 2,5 gramas de extrato seco para 100 gramas do gel base obtinha uma preparação farmacêutica com melhores características visuais e maior facilidade para incorporação à

base. Os ensaios de controle de qualidade foram conduzidos utilizando a formulação de gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* Mart. 2,5%.

5.7.2 Controle de qualidade do gel dentifrício

Com base na RDC nº 07 de 10 de Fevereiro de 2015, o gel dentifrício classifica-se como um produto de higiene pessoal Grau 1, possuindo características elementares que não necessita inicialmente de comprovação e informações detalhadas acerca do modo de uso e restrições. Tal classificação norteia os processos de regulamentação, rotulagem e ensaios que devem ser realizados para obtenção da preparação farmacêutica.

Nos ensaios de estresse térmico e resistência a centrifuga as amostras são submetidas a condições excessivas de calor e agitação com finalidade de acelerar o aparecimento de possíveis condições de instabilidade, tais como precipitação, turvação ou separação de fase. As amostras não apresentaram alterações nas características macroscópicas em ambos os ensaios, permanecendo com consistência homogênea e aspecto firme, sugerindo a existência de estabilidade física (FRIEDRICH et al., 2007).

Entretanto, esses resultados preliminares não fornecem informações quanto a estabilidade de longa duração. Por isso, faz-se necessário a realização de ensaios complementares de estabilidade acelerada com os ciclos de aquecimento e resfriamento, bem como avaliação durante o armazenamento em condições ambientais de temperatura.

5.7.2.1 Estudo de Estabilidade Preliminar

O presente estudo desenvolveu dois ensaios característicos de estabilidade preliminar do gel dentifrício. No primeiro deles, a preparação foi submetida a 12 ciclos de 24 horas nas condições de aquecimento em estufa (6 ciclos de 24 horas) e resfriamento (6 ciclos de 24 horas). Após transcorrido o ciclo de 24 horas, as características organolépticas foram avaliadas e não foram identificadas alterações macroscópicas na preparação farmacêutica.

O segundo estudo de estabilidade preliminar conduzido foi a avaliação das características macroscópicas e organolépticas, bem como o pH da preparação farmacêutica ao longo do tempo de 90 dias. A Tabela 57 apresenta os resultados preliminares do estudo de estabilidade do gel dentifrício avaliado em condições de temperatura ambiente, simulando o armazenamento do produto em ambiente doméstico.

Tabela 57 - Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade em condições ambientais.

	Tempo (dias)					
	0	7	15	30	60	90
Características	Translúcido					
Organolépticas	Amarelo- Esverdeado	*	*	*	*	*
	Odor Característico					
pH	6,95	6,87	6,85	6,83	6,80	

* Ausência de alterações

As características macroscópicas foram visualizadas quanto a cor, odor, aspecto e textura. No tempo 0, imediatamente após a manipulação, o gel dentifrício apresentou-se com coloração translúcida amarelo- esverdeado, semelhante ao extrato seco por aspersão, e odor característico do flavorizante alecrim pimenta. Nos demais pontos de observação, não houveram alterações macroscópicas e organolépticas. A avaliação das características desse parâmetro representa uma grande relevância para o produto final e, consequentemente, aceitação do consumidor (CENTURIÃO et al., 2021).

A determinação do pH mede o potencial hidrogeniônico e caracteriza a formulação quanto a acidez, neutralidade e alcalinidade (VOGEL et al., 2022). O gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* apresentou pH próximo a neutralidade durante os 90 dias de armazenamento em prateleira, demonstrando a ausência de processos de degradação e oxidativos.

5.7.2.2 Determinação do conteúdo de saponinas no gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* Mart.

A determinação do conteúdo de saponinas no gel dentifrício procedeu-se utilizando a equação da reta proveniente da avaliação do parâmetro da linearidade utilizando o sobrenadante do extrato seco do *Z. joazeiro* Mart. Foram realizadas 12 medições, em dois dias consecutivos, e os resultados foram expressos em concentração (Tabela 58).

Os dados apresentados na Tabela 58 demonstram boa precisão do método para quantificação de saponinas presentes no gel dentifrício a base de *Z. joazeiro* Mart.

Tabela 58 - Concentração de saponinas em miligrama por grama de gel dentifrício.

n amostral	DIA 01	DIA 02
	[Saponinas mg/g]	[Saponinas mg/g]
1	15,25	15,27
2	15,56	15,17
3	15,35	15,09
4	15,42	15,12
5	15,49	15,25
6	15,50	15,20

A verificação dos metabólitos secundários presentes em formulações a base de plantas medicinais, representa um parâmetro importantíssimo para o controle de qualidade, visto que esses compostos influenciam consideravelmente na qualidade, eficácia e segurança do produto desenvolvido.

Caieiro e Marcucci (2010) avaliaram a composição química de formulações comerciais a base de *Ginko biloba L.* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Por meio da análise de fingerprint os autores identificaram a presença de derivados de quercetina e canferol nas amostras analisadas.

6 CONCLUSÃO

O estudo da produção vegetal do *Ziziphus joazeiro* Mart. Lotes 01, 02 e 03 referentes aos indivíduos jovens, forneceu informações relevantes quanto a utilização dos indivíduos jovens como material vegetal para obtenção de ingrediente ativo farmacêutico.

- O processo de secagem por aspersão das soluções hidroalcoólicas do *Z. joazeiro* Mart. em escala ampliada mostrou-se satisfatório, apresentando uma porcentagem de rendimento superior a 85%.
- A adaptação da proposta de complexação de proteínas e taninos utilizando albumina humana demonstrou ser uma excelente estratégia para quantificação de saponinas de forma inequívoca usando o método colorimétrico vanilina-acidificada.
- Os métodos analíticos validados e validados parcialmente para quantificação dos metabólitos secundários, saponinas- taninos e saponinas, atenderam as especificações preconizadas na legislação brasileira, podendo ser aplicado em análises laboratoriais rotineiras.
- O conteúdo de saponinas nos Lotes 02 e 03 referentes aos indivíduos jovens após 12 e 18 meses de cultivo foram superiores ao quantificado no indivíduo adulto, representando excelentes candidatos a insumo ativo farmacêutico, fornecendo contribuições significativas para indústria de fitomedicamentos e fitocosméticos.
- O gel dentifrício à base de *Z. joazeiro* Mart. 2,5% apresentaram estabilidade preliminar quando submetidos a estresses térmico e agitação vigorosa. Além disso, quando avaliado em condições de prateleira por 90 dias, permaneceram com pH e propriedades organolépticas inalteradas demonstrando boa composição da preparação. Entretanto, faz-se necessário estudos complementares de estabilidade.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. et *al.* Trends and challenges in phytotherapy and phytocosmetics for skin aging. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n.8, 2022.
- AL- KHATTAWI, A. The design and scale-up of spray dried particle delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 2018.
- ALVES, M. H.; MEIRELES, M. P. A.; LEMOS, J. R. Percepção dos alunos de duas escolas do ensino básico sobre plantas medicinais, município de Buriti dos Lopes, norte do Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Espacios**, v. 38, n. 50, p. 8, 2017.
- AMARANTE, O. P. de. Determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2002.
- ANA. Água e Floresta: uso sustentável da Caatinga. Uso racional e reuso de água- Capacitação para gestão das águas/EAD. (Conservação, Uso Racional e Sustentável da Água). [S. l.]: Agência Nacional de Águas e Serviço Florestal Brasileiro, 2014. Disponível: <http://dspace.agencia.gov.br:8080/conhecerhana/2219> Acesso: 13 março 2023.
- ANDRADE, J. C. et *al.* Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, p. 226-233, 2019a.
- ANDRADE, J. C. et *al.* UPLC-MS-ESI-QTOF characterization and evaluation of the antibacterial and modulatory antibiotic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart. aqueous extracts. **South African Journal Botany**, v. 123, p. 105- 112, 2019b.
- ARAÚJO, C. S. F.; SOUSA, A. N. Estudo do processo de desertificação na Caatinga: uma proposta de educação ambiental. **Ciência & Educação**, v. 17, p. 975-986, 2011.
- ARAÚJO, B. A. et *al.* Caracterização biométrica de frutos e sementes, química e rendimento de polpa de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.). **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 15 -21, 2015.
- ARAÚJO-FILHO, J. A. Manejo Pastoril Sustentável da Caatinga. Projeto Dom Helder Camara, Recife, 2013.

BACANLI, M.; DILSIZ, S. A.; BASARAN, N.; BASARAN, A. Effects of phytochemicals against diabetes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 89, 2019.

BARBOSA-FILHO, J. M.; TRIGUEIRO, J. A.; CHERIYAN, U. O.; BHATTACHARYYA, J. CONSTITUENTS OF THE STEM-BARK OF ZIZIPHUS JOAZEIRO. **Journal of Natural Products**, v. 48, n.1, p. 152- 153, 1985.

BARBOSA, T. N. ATIVIDADE OVICIDA in vitro DO EXTRATO SALINO DAS FOLHAS DO *Ziziphus joazeiro* MART. EM NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS. 2019. 57f. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

BARVE, K.H.; LADDHA, K.S.; JAYAKUMAR, B. Extraction of saponins from Safed Musli. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, p. 561-564, 2010.

BISWAS, T.; DWIVEDI, U. N. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. **Protoplasma**, v. 256, p. 1469- 1486, 2019.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, n.1, p. 44–52, 2011.

BONFILIO, R. et al. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: A practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 87-100, 2012.

BORIOLO, M. F. G. et al. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay. *Genetics and Molecular Biology*, v. 37, n. 2, p. 428-438, 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 25 jul. 2017.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014) Instrução Normativa IN nº 4, de 18 de junho de 2014b. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017) Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2015) Resolução RDC N° 07, de 10 de Fevereiro de 2015. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 31 de março de 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas de Registro e Notificação de Medicamentos Fitoterápicos. Brasília, 2018. BRASIL, Ministério da Saúde. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasil. 146p. Brasília, 2006.

BRITO, S. M. O. et *al.* Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. Using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, v. 186, p. 185-191, 2015.

BROADHURST R. C.; JONES W. T. Analysis of Condensed Tannins using Acidified Vanillin. **Journal Science Food Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290908>

CAETANO, S. K. Obtenção de um dentifrício contendo extrato seco por aspersão padronizado de *Libidibia ferrea* com atividade antimicrobiana contra patógenos bucais. 2014. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

CAETANO, M. O.; FAGUNDES, A. B.; GOMES, L. P. Modelo de regressão linear para estimativa de geração de RCD em obras de alvenaria estrutural. **Ambiente Construído**, v. 18, n. 2, p. 308-324, 2018.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 99, p. 575-586, 2010.

CARTAXO-FURTADO et al. Investigation of thermal and kinetic behavior of the *Stryphnodendron adstringens* dry extract with antimicrobial activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-3, 2019.

CARVALHO, P. E. R. Juazeiro, *Ziziphus joazeiro*: taxonomia e nomenclatura. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2007. 8p. (Circular Técnica, 139). Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/circtec/edicoes/Circular139.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2020.

CAIEIRO, D. M.; MARCUCCI, M. Composição Química e Atividade Antioxidante de Formulações Comerciais contendo *Ginkgo biloba* L. **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, 2010.

CAVALCANTI, I. F. A. Grande escala e características sinóticas associadas a extremos precipitação sobre a América do Sul: uma revisão e estudos de caso para a primeira década do século 21. **Atmospheric Research**, v. 118, p. 27-40, 2012.

CENTURIÃO, P. O. et al. Evaluación de la calidad de los productos cosméticos que contienen ácido glicólico. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 50, 2021.

CHANG, Y. et al. Optimization of extraction process of *Dioscorea nipponica* Makino saponins and their UPLC-QTOF-MS profiling, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 4, 2023.

CHEIN, F. Introdução aos modelos de regressão linear: Um passo inicial para a compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas. Brasília: Enap, 2019.

CHEN, Y.; XIE, M-Y.; GONG, X-F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 162-170, 2007.

CHEOK, C. Y. et al. Extraction and quantification of saponins: Review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014

CORDEIRO, J. M. P. et al. Levantamento Florístico Preliminar da Caatinga Sublitorânea na Paraíba, Nordeste do Brasil. **Geografia**, v. 40, p. 241-257, 2015.

CUINICA, L. G.; MACEDO, R. O. Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, p. 591-602, 2019.

COSTA, C. T. C. et al. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.4, p.108-116, 2008.

CRUZ, M. C. S et al., Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007

DEVENS, J. A.; JUNIOR, A. R. B.; SILVA, G. Q. Modelo de quantificação do coeficiente de dispersão longitudinal de pequenos cursos de água naturais. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 269- 276, 2006.

DONG, J. et al. Saponins regulate intestinal inflammation in colon cancer and IBD. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 66 -72, 2019.

DRUMOND, M. A. et al. Avaliação e identificação de ações prioritárias, para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga: estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. Petrolina, 23p, 2000.

EIFLER, T.; SCHLEICH, B. A. Robust Design Research Landscape – Review On The Importance Of Design Research For Achieving Product Robustness. **International Conference Eng Des**, v. 1, p. 211-220, 2021.

ESPÍRITO- SANTO, M. M. et al. TANNINS IN *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA* (ASTERACEAE): EFFECTS OF SEASONALITY, WATER AVAILABILITY AND PLANT SEX, **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 2, p. 167 – 174, 1999.

FARMACOPEIA Brasileira, 6ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FERNANDES, J. P. S. et al. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 890- 893, 2013.

FERNANDES, F. H. A. et al. Quality standardization of herbal medicines of *Spondias dulcis* Parkinson using analytical and microbiological analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, p. 1923- 1928, 2018.

FORMULÁRIO Nacional da Farmacopeia, 2ª Edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.

FRIEDRICH, M. et al. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Creme Não Iônico Inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 558- 562, 2007.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Long optical path length spectrophotometry in conventional double-beam spectrophotometers: a simple alternative for investigating samples of very low optical density. **Química Nova**, v. 32, n. 2, 2009.

GARCIA, M. A. C. S.; ARAÚJO FILHO, J. C.; SILVA, H. P. Estudo espaço temporal de áreas susceptíveis à desertificação do semiárido brasileiro. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 3, p. 352-370, 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374- 381, 2007.

GOETZ, S. et al. Robustness Evaluation Of Product Concepts Based On Function Structures. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENGINEERING DESIGN**, v.1, p. 3521–3530, 2019.

GOETZ, S. et al. Simultaneous definition of key characteristics in order to facilitate robust design in early product development stages. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENGINEERING DESIGN**, v. 1, p. 2691- 2700, 2021.

GONÇALVES, R. A.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. G. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM COSMÉTICOS POR HPLC-DAD. **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 175- 180, 2020.

GOMES, A. C. et al. Reproductive phenology in the standardization of tannins in plant drugs of specimens of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, p. 561- 573, 2021.

GOMES, C. M. et al. Laboratory-Scale Preparation and Characterization of Dried Extract of Muirapuama (*Ptychopetalum olacoides* Benth) by Green Analytical Techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 2, 2021.

GOMES, C. L. et al. Development of an analytical method for determination of polyphenols and total tannins from leaves of *Syzygium cumini* L. Skeels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 2, 2021.

GUEDES, R. D. S.; ZANELLA, F. C. V.; JÚNIOR, J. E. V. C.; SANTANA, G. M.; SILVA, J. A. Caracterização florístico-fitossociológica do componente lenhoso de um trecho de caatinga no semiárido paraibano. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 99-108, 2012.

GUIMARÃES, G. P. et al. Thermoanalytical characterization of herbal drugs from *Poincianella pyramidalis* in different particle sizes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, p. 661-670, 2018

GROSS, A. V. et al. Medicinal plants for the "nerves": a review of ethnobotanical studies carried out in South Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 2, 2019.

HABICHT, S. D. et al. Quantification of antidiabetic extracts and compounds in bitter gourd varieties. **Food Chemistry**, v. 126, p. 172-176, 2011.

HAECKEL, R.; SONNTAG, O. Validation of quantitative analytical procedures in laboratory Medicine. **Journal of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 111-118, 2012.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, 1978.

HAECKEL, R.; SONNTAG, O. Validation of quantitative analytical procedures in laboratory Medicine. *Journal of Laboratory Medicine*, v. 36, n. 2, p. 111-118, 2012.

HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HIAI, S.; OURA, H.; HAKAJIMA, T. Colour reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulphuric acid. **Planta Medica**, v. 29, p. 116-122, 1976.

HIGUCHI, R. et. al. Triterpenoid saponins from the bark of *Ziziphus joazeiro*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2597- 2600, 1984.

International Conference on Harmonization. ICH Q2A: Text on Validation—Analytical Procedures. Published in Federal Register. vol. 60, p. 11260, 1995.

International Conference on Harmonization. ICH Q2B: Analytical Validation-Methodology. Published in Federal Register vol. 62, p. 27463-7, 1996.

ISAAC, V. L. B. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 1, p. 81- 96, 2008.

JACOBI, L. F.; SOUZA, A. M.; PEREIRA, J. E. S. Gráfico de controle de regressão aplicado na monitoração de processos. **Revista Produção**, v. 12, n. 1, 2002.

KANG, K. B. et al. Comprehensive mass spectrometry-guided phenotyping of plant specialized metabolites reveals metabolic diversity in the cosmopolitan plant family Rhamnaceae. **The Plant Journal**, v. 98, p. 1134- 1144, 2019.

KATO, E. T. M. et al. Estudo químico das cascas do caule do *Ziziphus joazeiro* Martius. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. V. 33, n. 1, p. 47-51, 1997.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. G. PLANTAS MEDICINAIS: Cura Segura?. **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

JUNIOR, J. O. C. S. et al. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, 2006.

LACERDA, A. V. de; BARBOSA, F. M.; BARBOSA, M. R. de V. Estudo do Componente Arbustivo-arbóreo de Matas Ciliares na Bacia do Rio Taperoá, Semiárido Paraibano: uma Perspectiva para a Sustentabilidade dos Recursos Naturais. **Oecologia Brasiliensis**. vol. 11, no. 03, p. 331–340, 2007.

- LAVRA, Z. M. M. et al. Development and validation of an analytical method for simultaneous determination of fixed-dose combination tablets of lamivudine, zidovudine and nevirapine by high performance liquid chromatography. *Química Nova*, v. 31, p.969-974, 2018.
- LE, A. V. et al. Improving the Vanillin-Sulphuric Acid Method for Quantifying Total Saponins. **Thecnologies**, v. 84, n. 6, 2018.
- LEAL, I.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Universidade Federal do Pernambuco, 2003.
- Leite, G. Q. ANÁLISE TÉRMICA DE HORMÔNIOS BIOIDÊNTICOS: UMA ABORDAGEM QUANTITATIVA. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- LEITE et al. Analytical Method By Hplc-Dad Allows Quantification Of Quercetin Marker In Standardized Extract Of Anadenanthera Colubrina Var. Cebil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, 2017.
- LI, H.; HUANG, W.; WEN, Y.; GONG, G.; ZHAO, Q.; YU, G. Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1147-1156, 2010.
- LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M. Rhamnaceae. In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, v.4, p. 331-341. São Paulo. 2005.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n. 2, 2005.
- MAAINDEN, E. E. et al. Genus *Ziziphus*: A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, 2019.
- MACIEL; M. A. M.; PINTO, A. G.; JUNIOR, V. F. V. PLANTAS MEDICINAIS: A Necessidade de Estudos Multidisciplinar. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADMON, M. et al. Development and Validation of an Innovative Analytical Approach for the Quantitation of Tris (Hydroxymethyl)Aminomethane (TRIS) in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 28, n. 73, 2023.

MAGALHÃES, K. N.; BANDEIRA, M. A. M.; MONTEIRO, M. P. Plantas medicinais da Caatinga do Nordeste Brasileiro. Etnofarmacopeia do professor Francisco José de Abreu Matos. **Imprensa Universitária**. Fortaleza, 2020.

MAHOMOODALLY, M. F.; RAMJUTTUN, P. A quantitative ethnobotanical survey of phytocosmetics used in the tropical island of Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 45-59, 2016.

MALAMAN C. S.; AMORIM, A. Método Para Determinação De Valores Na Avaliação Imobiliária: comparação entre o Modelo de Regressão Linear e Lógica Fuzzy. **Boletim de Ciências Geodésicas**, v. 23, p. 87 – 100, 2017.

MARENGO, J. A. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: Ministério do Meio Ambiente Brasil. 2006. 202 p.

MARMONTEL, C. V. F.; RODRIGUES, V. A. Parâmetros indicativos para qualidade da água em nascentes com diferentes coberturas de terra e conservação da vegetação ciliar. *Floresta e Ambiente*. v. 22, n. 2, p. 171–181, 2015.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de Bauhinia forficata. **Química Nova**, v. 35, n. 3, 2012.

MARREIROS, N. A. et al. CONHECIMENTO BOTÂNICO TRADICIONAL SOBRE PLANTAS MEDICINAIS NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA (NORDESTE, BRASIL). **Revista Ouricuri**, v. 5, n. 1, 2015.

MELO, J. G. et al. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* Mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 43-51, 2012.

Ministério do Meio Ambiente. Caatinga Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 21 de agosto de 2019.

MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 16, n. 2, p. 89-91, 2017.

MOHALAKOANA, M.; MOTEETEE, A. Southern African Soap Plants and Screening of Selected Phytochemicals and Quantitative Analysis of Saponin Content. **Resources**, 2021. <https://doi.org/10.3390/resources10100096>

MOHAMMAD, I. et al. Phytocosmeceutical formulation development, characterization and its *in-vivo* investigations. **Biomedicine& Pharmacotherapy**, v. 107, p. 806- 817, 2018.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. Critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. **Oecologia**, v. 72, p. 148- 156, 1987.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, J. M. TEOR DE TANINOS EM TRÊS ESPÉCIES MEDICINAIS ARBÓREAS SIMPÁTRICAS DA CAATINGA. **Sociedade de Investigações Florestais**, v. 29, n. 6, p. 999- 1005, 2005.

MORAIS, S. A. Otimização do processo de extração de taninos a partir da espécie *Mimosa Tenuiflora* (WILLS). Poiret. 2019. 98f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso Popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, 2009.

MOSES, T. et al. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. **Critical Rev Biochem Mol Biol**, v. 49, n. 6, p. 439–462, 2014.

NASCIMENTO, A. M. et al. *Ziziphus joazeiro*, a Saponin-Rich Brazilian Medicinal Plant: Pharmacognostic Characterization of Bark and Leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 756-764, 2020.

NASCIMENTO, A. M.; TORRES, J. C.; MARQUES, C. A. Caracterização morfo-anatômica e testes fitoquímicos em amostras comerciais de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Revista Fitos**, v. 10, p. 375-547, 2016.

NASCIMENTO- JUNIOR, B. J. et al. Percepções sobre o uso de plantas medicinais por profissionais de áreas rurais e urbanas em cidade no nordeste do Brasil. **Revista Fitos**, v. 15, n. 2, p. 231- 241, 2021.

NCUBE, B.; NGUNGE, V. N. P.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 775–780, 2011.

NETO, M. A. S. *Ziziphus joazeiro* Martius: ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS, FRACIONAMENTO BIOGUIADO ANTI- *Candida* E AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL. Dissertação de Mestrado. 2016. 262f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

NUNES, D. B.; NETO J. P. B.; FREITAS, S. M. Modelo de regressão linear múltipla para avaliação do valor de mercado de apartamentos residenciais em Fortaleza, CE. **Ambiente Construído**, v. 19, p. 89-104, 2019.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. POTENCIALIDADES DA UTILIZAÇÃO DE TANINOS NA CONSERVAÇÃO DE FORRAGENS E NUTRIÇÃO DE RUMINANTES- REVISÃO. **Archives of Veterinary Science**, v.12, n.1, p. 1-9, 2007.

OLIVEIRA, D. F. LEVANTAMENTO ETNOFARMACOLÓGICO SOBRE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS CITADOS PARA TRATAMENTOS DE

CASOS SUSPEITOS DE MICOSES SUPERFICIAIS NO MUNICÍPIO DE CUITÉ – PB. 2015. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande.

PALACIOS, C. E. et al. Contents of tannins of cultivars sorghum cultivated in Brazil, as determined by four quantification methods. **Food Chemistry**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127970>

PATIL, Jagadevappa et al. Spray-Drying: Na Emerging Technique for Pharmaceutical Product Development. **Journal of Pharmacovigilance**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 1-2, 2016. Disponível em: www.walshmedicalmedia.com. Acesso em: 15 out. 2022

PAUPITZ, J. Elementos da estrutura fundiária e uso da terra no Semiárido Brasileiro. In: GARIGLIO, M. A; SAMPAIO, E. V. S. B; CESTARO, L. A; KAGEYAMA, P. Y. (Orgs.). Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília:Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

PEREIRA et al. Physicochemical characterization of the vegetal drug and nebulized extract of the roots from *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae): An efficient experience in quality control of plant raw materials. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, p. 361- 368, 2018.

PINTO, M. V. Controle de qualidade físico-químico de comprimidos de ibuprofeno 300 mg. **Revista Fitos**, v. 1, n. 2010, 2014.

POTHIARAJ, G. et al. Investigation of therapeutic and immunomodulatory activity of Bacopa saponin from *Bacopa monnieri*. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 639-650, 2022.

PRUNZEL, J. et al. MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA APLICADOS À AVALIAÇÃO DE TERRENOS URBANOS - CASO DO MUNICÍPIO DE ITAQUI-RS. **Boletim de Ciências Geodésica**, v. 22, n. 4, p. 651-664, 2016.

QU, Z.; WANG, H.; JIN, Y.; LI, Y.; WANG, Y. Isolation, identification, and quantification of triterpene saponins in the fresh fruits of *Panax notoginseng*. **Natural Product Research**, v. 36, n. 20, p. 5319- 5329, 2022.

RAVAZOLI, M. R. Extrato seco de Mouriri pusa Gardner (Melastomataceae): preparação, quantificação de flavonoides, secagem por aspersão e citotoxicidade. 2019. Dissertação – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.

RE´, M. I. et al. MICROENCAPSULATION BY SPRAY DRYING. MICROENCAPSULATION BY SPRAY DRYING, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1195-1236, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373939808917460>. Acesso em: 15 ago. 2022

REGO, E. L. Estudo Etnobotânico da utilização do juá *Ziziphus Joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) na comunidade do sítio Serra Verde- PE. **Brazilian Journal Health Review**, v. 2, p. 5801-5810, 2019.

REIS, A. P. L. et al. Levantamento Florístico das Espécies nativas da Caatinga do estado do Ceará. **Brazilian Journal Animal Enviromental Research**, v. 4, p. 3060-3078, 2021.

RESENDE, M. R. et al. Ensaio de mutagenicidade do extrato do *Zizyphus joazeiro* Mart. Empregando teste de micronúcleo em roedores in vivo. In: Congresso de Farmácia da UNIFENAS, 7, 2008. Alfenas.

RIBANI M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 501-510, 2014.

RIBEIRO, B. D. et al. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 736- 743, 2013.

RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 965- 975, 2013.

RIBEIRO, P. T. et al. Physicochemical characterization and cosmetic applications of *Passiflora nitida* Kunth leaf extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 2022.

RODRIGUES, A. P.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 721- 730, 2014.

ROMÃO, M. O. C. et al. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 3, p. 222-227, 2010.

RUNHA, F. P. Production of dry extracts of medicinal Brazilian plantas by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. **Food Bioproducts processing**, v. 79, n. 3, p. 160-168, 2001.

SAMPAIO, V. S. B.; SAMPAIO, Y.; ARAUJO, T. V. S.; SAMPAIO, G. R. Desertificação no Brasil: Conceitos, Núcleos e Tecnologias de Recuperação e Convivência. Recife: Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 202 p.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 302–315, 2007.

SANTOS, F. M. et al. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629- 1633, 2011.

SANTOS, A. C. S.; PINTO, R. L. M. Aplicação da análise de correlação e regressão linear simples no setor sucroenergético brasileiro. **Exacta**, v. 16, n. 2, p. 155- 167, 2017.

SCHENKEL, E. P. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 711-740, 2003.

SCHUHLY, W. et al. New Triterpene with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 740- 743, 1999.

SCHUHLY, W. et al. Novel Triterpene Saponins from *Zizyphus joazeiro*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 83, n. 7, p. 1509-1516, 2000.

SENA, L. M. M. Conheça e Conserve a Caatinga - O Bioma Caatinga. vol.1 ed. Fortaleza: Caatinga, Associação, 2011.

SILVA, J. L. et al. Avaliação física e físico- química dos frutos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) em diferentes estádios de maturação. **Revista Verde Agroecologia Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, p. 177-181, 2016.

SILVA, R. M. F. et al. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, 2013.

SILVA, L. F.; JORDAN-SINISTERRA, M.; LANÇAS, F. M. Métodos analíticos para determinação de isoflavonas em matrizes complexas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, p. 219-228, 2018.

SILVA, R. S. et al. Juá (*Zizyphus joazeiro* Mart.) mucilage and juá by-product phenolic extract improve quality parameters and retain bioactive compounds in fresh-cut pineapple during storage. **Food Research International**, v. 161, 2022.

SILVA, P. H. R. DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA E CROMATOGRAPHIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA. 2017. 239f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

SILVA, B. R.; ALMEIDA, C. F. C. B. R. ESTUDO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS MEDICINAIS DA MATA CILIAR DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO, NORDESTE DO BRASIL. **Revista de Ouricuri**, v. 10, n. 01, p. 11-26, 2020.

SILVA, R. M. F. et al. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 201.

SOUSA, C. M. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, 2007.

SOUZA, Aline Viviane de et al. APLICAÇÃO DA SECAGEM POR SPRAY DRYING PARA A PRODUÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS SECOS. *UNILAGO Revista Científica*, [s. l.], v. 1, ed. 1, p. 181-196, 2013. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/revista>. Acesso em: 8 set. 2022.

SOUZA, B. I.; ARTIGAS, R. C.; LIMA, E. R. V. Caatinga e Desertificação. **Mercator**, v. 14, p. 131- 150, 2015.

SOUZA, J. A. N.; RODAL, M. J. N. Levantamento florístico em trecho de vegetação ripária de caatinga no Rio Pajeú, Floresta/Pernambuco-Brasil. *Caatinga*. vol. 23, nº. 4, p. 54–62, 2010.

SOUZA, C. et al. Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de *Bauhinia forficata* e *Passiflora alata* sobre seu perfil de dissolução. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 67- 75, 2015.

SOUSA, V. F.; SANTOS, C. A. G.; VERSIEUX, L. M. New Records In The Caatinga Of Paraíba State, Northeastern Brazil: *Spilanthes Urens* Jacq. (Asteraceae, Heliantheae) And *Bacopa Monnieri* (L.) Pennell (Plantaginaceae, Gratioleae). **Pesquisas Botânicas**, 2017.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal Ethnopharmacol**, v.94, p. 219-243, 2004.

Stricker, N.; Lanza, G. The Concept of Robustness in Production Systems and its Correlation to Disturbances. **Procedia CIRP**, v. 19, p. 87- 92, 2014.

SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE. Conselho Deliberativo da SUDENE. Resolução n. 151/2021. Delimitação do semiárido. p. 52, 2021.

SURESH R et *al.* Evaluation of Improved and Current Vanillin Based Colorimetric Quantification of Methods of Triterpenoids. **Journal of Student Research**, v. 10, n. 2, 2021.

The Plant List, 2013. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/>>. Acessado em: 22 de Julho de 2021.

TABARELLI, M.; LEAL, I. R.; SCARANO, F. R.; SILVA, J. M. C. da. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**. v. 70, n. 4, p. 25–29, 2018.

TEIXEIRA, M. N. O sertão semiárido. Uma relação de sociedade e natureza numa dinâmica de organização social do espaço. **Sociedade e Estado**, v. 31, n. 3, p. 769-797, 2016.

TRAVASSOS, I. S.; SOUZA, B. I.; SILVA, A. B. Secas, desertificação e políticas públicas no semiárido nordestino brasileiro, Revista OKARA: Geografia em debate, v.7, n.1, p. 147-164, 2013.

TRINDADE, E. P. et *al.* Laboratory-Scale Preparation and Characterization of Dried Extract of Muirapuama (*Ptychopetalum olacoides* Benth) by Green Analytical Techniques. **Molecules**, v. 95, n. 1095, 2020.

UCEFF. Disponível em < <https://blog.uceff.edu.br/afinal-por-que-se-especializar-em-producao-vegetal/> > . Acessado em: 27 de Agosto de 2019.

VASCONSELHOS, E. A. F. et *al.* Influência do Processo Extrativo, Solvente e Tamanho da Partícula do Material Vegetal no Teor de Sólidos Totais da Solução Extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, v. 1, p. 74 – 79, 2005.

VASCONSELOS, E. S. et *al.* Agrupamento de modelos de regressão da análise de adaptabilidade e estabilidade de genótipos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1357- 1362, 2010.

VASCONSELOS, E. A. F. et *al.* Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 03, 2005.

VIGO, C. L. S. et al. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – *Amaranthaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 46- 49, 2004.

VIRGÍNIO, T. et al. Utilização de plantas medicinais por pacientes hipertensos e diabéticos: estudo transversal no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 31, n. 4, 2018.

VOGEL, E. M. et al. Quality of cosmetics with active caffeine in cream and gel galenic bases prepared by compounding pharmacies. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

WEI, Y. et al. Separation of a new triterpenoid saponin together with six known ones from *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh and evaluation of their cytotoxic activities. **Natural Product Research**, v. 5, 2022.

WYKOWSKI, R. Saponinas: uma promessa da ciência contra o câncer. 2012. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, L-T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.

ZANNOU, O. et al. (2022) Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction. **Arabican Journal Chemical**, v. 15, 2022.