

completar o volume com a *Fase móvel* e homogeneizar. Transferir 1 mL da solução obtida para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com *Fase móvel* e homogeneizar.

Adequabilidade do sistema

Resolução entre picos: Solução amostra, mínimo 1,0 entre os picos referentes a isoboldina e a boldina.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução referência* e 20 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos referentes a boldina e aos seis alcaloides descritos a seguir. Os tempos de retenção relativos à boldina são, aproximadamente, 0,9 para isoboldina, 1,0 para boldina, 1,8 para *N*-óxido de isocoridina, 2,2 para laurotetanina, 2,8 para isocoridina e 3,2 para *N*-metil laurotetanina. Calcular o teor de alcaloides totais expressos em boldina, em porcentagem, segundo a expressão:

$$TA = \frac{\sum A_1 \times m_2 \times P}{A_2 \times m_1 \times 100}$$

em que,

TA = teor de alcaloides totais expressos em boldina % (p/p);

$\sum A_1$ = soma das áreas sob os picos correspondentes aos seis alcaloides identificados no cromatograma obtido com a *Solução amostra*;

m_1 = massa em gramas de amostra, determinada a partir da densidade;

m_2 = massa em gramas de boldina na *Solução referência*;

A_2 = área sob o pico correspondente à boldina na *Solução referência*; e

P = pureza percentual declarada da substância de referência boldina.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente hermeticamente fechado ao abrigo da luz e do calor.

CALÊNDULA, extrato fluido *Calendulae extracta fluida*

O extrato fluido é obtido a partir de flores secas de *Calendula officinalis* L., contendo, no mínimo, 0,4% de flavonoides totais, expressos como hiperosídeo (C₂₁H₂₀O₁₂, 464,38).

PREPARAÇÃO

O extrato fluido é preparado na proporção droga:solvente 1:1 (p/v), por percolação, utilizando etanol a 70,0% como líquido extrator.

CARACTERÍSTICAS

Líquido de coloração marrom escuro, com odor característico.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*.

Fase estacionária: sílica-gel F₂₅₄(0,25 mm).

Fase móvel: acetato de etila, ácido fórmico anidro e água (80:10:10).

Solução amostra: secar 0,5 mL do extrato fluido até resíduo, em banho-maria, em temperatura não superior a 60°C. Adicionar 2 mL de metanol e filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

Solução referência (1): dissolver uma quantidade pesada, com exatidão, de rutina em metanol, para obter a concentração de 250 µg/mL.

Solução referência (2): dissolver uma quantidade pesada, com exatidão, de ácido clorogênico em metanol, para obter a concentração de 100 µg/mL.

Solução referência (3): dissolver uma quantidade pesada, com exatidão, de ácido cafeico em metanol, para obter a concentração de 100 µg/mL.

Procedimento: aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra*, 20 µL da *Solução referência (1)*, 20 µL da *Solução referência (2)* e 20 µL da *Solução referência (3)*. Desenvolver o cromatograma. Remover a cromatoplaça e deixar secar ao ar. Nebulizar a placa com difenilborato de aminoetanol SR, e a seguir com solução de macrogol 400 (PEG) a 5% (p/v) em etanol. Aquecer entre 100 °C e 105 °C por aproximadamente 5 minutos. Examinar sob a luz ultravioleta em 365 nm.

Resultados: no esquema abaixo estão representadas as zonas obtidas com a *Solução amostra*, *Solução referência (1)*, *Solução referência (2)*, *Solução referência (3)*. Outras zonas podem ocasionalmente estar presentes.

Parte superior da placa	
Ácido cafeico: Zona de fluorescência azul clara	Zona de fluorescência azul clara Zona de fluorescência azul
Ácido clorogênico: Zona de fluorescência azul	Zona de fluorescência esverdeada Zona de fluorescência azul
Rutina: Zona de fluorescência amarela	Zona de fluorescência esverdeada Zona de fluorescência amarela Zona de fluorescência amarelo-esverdeado
<i>Solução referência</i>	<i>Solução amostra</i>

TESTES

Densidade relativa (5.2.5). 0,9660 a 0,9970.

Etanol (5.3.3.8.1). *Método II.* 52,0% (v/v) a 56% (v/v).

Resíduo seco (5.4.2.2.2). No mínimo 18,0% (p/p).

Metanol e 2-propanol (5.4.2.2.1). No máximo 0,05% (v/v) de metanol e no máximo 0,05% de 2-propanol.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Flavonoides totais

Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Preparar soluções como descrito a seguir.

Solução estoque: em um balão de fundo redondo, adicionar 0,8 mL do extrato fluido de calêndula. Acrescentar 1 mL de solução de metenamina a 5 g/L, 20 mL de acetona e 7 mL de ácido clorídrico. A seguir, refluxar em banho-maria durante 30 minutos. Filtrar em papel de filtro, transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com acetona e homogeneizar. Transferir 20 mL da solução para um funil de separação e adicionar 20 mL de água. Extrair com uma quantidade de 15 mL e, a seguir, com três quantidades de 10 mL de acetato de etila. Após o processo de extração reunir as fases de acetato de etila, transferir para outro funil de separação e lavar com duas quantidades de 50 mL de água. Transferir a fase acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com acetato de etila e homogeneizar.

Solução amostra: transferir 10 mL da *Solução estoque* para um balão volumétrico de 25 mL, adicionar 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol. Completar o volume com a solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol e homogeneizar.

Solução branco: transferir 10 mL da *Solução estoque* para um balão volumétrico de 25 mL, completar o volume com solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol e homogeneizar.

Procedimento: medir a absorvância da *Solução amostra* em 425 nm, após exatamente 30 minutos, utilizando a *Solução branco* para ajuste do zero. Calcular o teor de flavonoides totais expresso em hiperosídeo, em porcentagem, segundo a expressão:

$$\text{TFT} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

em que,

TFT = teor de flavonoides totais expresso em hiperosídeo % (p/p);

A = absorvância medida para a *Solução amostra*; e

m = massa em gramas do extrato fluido de calêndula, determinado a partir da densidade.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente hermeticamente fechado ao abrigo da luz e do calor.

CALÊNDULA, tintura *Calendulae tinctura*

A tintura é obtida a partir de flores secas de *Calendula officinalis* L., contendo, no mínimo, 0,04% de flavonoides totais, expressos como hiperosídeo (C₂₁H₂₀O₁₂, 464,38).

PREPARAÇÃO

A tintura é preparada a 10,0% (p/v), por percolação ou maceração, utilizando etanol a 70,0% como líquido extrator.

CARACTERÍSTICAS

Líquido de coloração marrom escuro.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*,

Fase estacionária sílica-gel F₂₅₄ (0,25 mm).

Fase móvel: acetato de etila, ácido fórmico anidro e água (80:10:10).

Solução amostra: secar 1 mL da tintura até resíduo, em banho maria, em temperatura máxima de 60 °C. Adicionar 2 mL de metanol e filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

Solução referência (1): dissolver uma quantidade, exatamente pesada, de rutina em metanol, para obter a concentração de 250 µg/mL.

Solução referência (2): dissolver uma quantidade, exatamente pesada, de ácido clorogênico em metanol, para obter a concentração de 100 µg/mL.

Solução referência (3): dissolver uma quantidade, exatamente pesada, de ácido cafeico em metanol, para obter a concentração de 100 µg/mL.

Procedimento: aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra*, 20 µL da *Solução referência (1)*, 20 µL da *Solução referência (2)* e 20 µL da *Solução referência (3)*. Desenvolver o cromatograma. Remover a cromatoplaça e deixar secar ao ar. Nebulizar a placa com solução de difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 (PEG) a 5% (p/v) em etanol, aquecer a placa entre 100 °C e 105 °C por aproximadamente 5 minutos. Examinar sob a luz ultravioleta em 365 nm.