

Tempo (minutos)	Fase móvel (1) (%)	Fase móvel (2) (%)	Sistema de eluição
0 – 1	92	8	isocrático
1 – 20	92 → 75	8 → 25	gradiente linear
20 – 33	75	25	isocrático
33 – 35	75 → 0	25 → 100	gradiente linear
35 – 36	75 → 92	100 → 8	gradiente linear
36 – 40	92	8	isocrático

*Solução amostra:* homogeneizar a amostra em banho de ultrassom por 5 minutos, pipetar 1,0 mL do extrato fluido e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Lavar a ponteira do micropipetador pelo menos duas vezes com metanol. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm diretamente para um vial.

*Solução referência:* pesar, com exatidão, cerca de 12,0 mg de ácido clorogênico. Transferir para balão volumétrico de 100,0 mL e diluir com metanol. Transferir 1,2 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com metanol. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm diretamente para um vial.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e 20 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos referentes ao ácido clorogênico. Calcular o teor de ácido clorogênico, em porcentagem, segundo a expressão:

$$\text{TAC} = \frac{A_a \times m_2 \times P}{A_r \times m_1}$$

em que,

TAC = teor de ácido clorogênico % (p/p);

$A_r$  = área sob o pico correspondente ao ácido clorogênico na *Solução referência*;

$A_a$  = área sob o pico correspondente ao ácido clorogênico na *Solução amostra*;

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

$m_2$  = massa em gramas de ácido clorogênico;

P = pureza percentual declarada da substância de referência.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

### **ANGICO, casca** *Anadenantherae cortex*

A droga vegetal consiste de cascas secas do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, contendo, no mínimo, 6% de taninos totais e, no mínimo, 0,19% de catequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, 290,27).

## IDENTIFICAÇÃO

### A. Descrição macroscópica

As cascas caulinares secas apresentam-se em fragmentos levemente curvos e muito rígidos, resinosos, com 6,0 a 8,0 cm de comprimento, 0,5 a 2,5 cm de largura e 0,5 a 1,5 cm de espessura. A superfície externa é rugosa, de coloração pardacenta e é geralmente recoberta de placas esbranquiçadas a acinzentadas, com esparsas manchas pretas. A superfície interna é de coloração pardo-avermelhada, apresentando estrias longitudinais devido à presença de grossas fibras estreitas e opostas entre si.

### B. Descrição microscópica

Em secção transversal da casca há periderme bem desenvolvida, com 15 a 30 camadas de células tabulares, enfileiradas radialmente. No córtex, em secção transversal, há de 10 a 22 camadas ou mais de células de parênquima cortical achatadas radialmente, alternadas a faixas de fibras esclerenquimáticas; após as faixas de parênquima ocorrem faixas de feloderme, caracterizadas por células achatadas dispostas radialmente em fileiras sobrepostas. Raios e cordões parenquimáticos são evidentes. Algumas células parenquimáticas do parênquima cortical contêm cristais prismáticos, além de grãos de amido. Na secção longitudinal há camadas de fibras alternadas aos raios parenquimáticos.

### C. Descrição microscópica do pó

O pó atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São característicos: coloração castanho-clara; porções de células do parênquima; fragmentos de fibras esclerenquimáticas libríformes; células parenquimáticas com cristais prismáticos e com células pétreas.

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

*Fase estacionária:* sílica-gel F<sub>254</sub>, com espessura de 250 µm.

*Fase móvel:* acetato de etila, ácido fórmico e água (90:5:5).

*Solução amostra:* pesar 1 g da droga moída e colocar em balão de fundo redondo adicionando 10 mL de metanol. Aquecer, sob refluxo, durante 10 minutos. Filtrar em algodão.

*Solução referência:* pesar cerca de 1 mg de catequina e dissolver em 1 mL de metanol.

*Procedimento:* aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra* e 20 µL da *Solução referência*. Desenvolver o cromatograma. Remover a placa e deixar secar ao ar. Nebulizar a placa com vanilina a 1% (p/v) em etanol e, em seguida, nebulizar com ácido clorídrico.

*Resultados:* no esquema abaixo estão representadas as zonas obtidas com a *Solução referência* e a *Solução amostra*. Outras zonas podem ocasionalmente estar presentes.

Parte superior da placa	
Catequina: zona de coloração rósea-avermelhada	Zona de coloração rósea-avermelhada (catequina)
	Zona de coloração rósea-avermelhada Zona de coloração rósea-avermelhada Zona de coloração rósea-avermelhada
<i>Solução referência</i>	<i>Solução amostra</i>

## TESTES

**Perda por dessecação (5.2.9).** *Método gravimétrico.* No máximo 10%.

**Matéria estranha (5.4.1.3).** No máximo 1%.

**Cinzas totais (5.4.1.5.1).** No máximo 6%.

**Metais pesados (5.4.5).** Cumpre o teste.

**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.

**Resíduos de agrotóxicos (5.4.3).** Cumpre o teste.

## DOSEAMENTO

### Taninos totais

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

*Solução estoque:* pesar, com exatidão, cerca de 0,750 g da droga pulverizada e transferir para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada. Adicionar 150 mL de água e aquecer em banho-maria durante 30 minutos, à temperatura entre 85 °C e 90 °C. Resfriar em água corrente e transferir para um balão volumétrico de 250 mL. Lavar o balão de fundo redondo transferindo as

águas de lavagem com todo conteúdo da droga vegetal para o balão volumétrico. Completar o volume com água destilada. Deixar decantar e filtrar em papel de filtro o líquido sobrenadante. Desprezar os primeiros 50 mL do filtrado.

*Solução amostra para polifenóis totais:* diluir 5 mL da *Solução estoque* em balão volumétrico de 25 mL com água. Transferir volumetricamente 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v). Determinar a absorvância em 760 nm ( $A_1$ ) após 30 minutos, utilizando água para ajuste do zero.

*Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele:* a 10 mL da *Solução estoque*, adicionar 0,1 g de pó de pele e agitar mecanicamente em erlenmeyer de 125 mL durante 60 minutos. Filtrar em papel de filtro. Diluir 5 mL do filtrado em balão volumétrico de 25 mL com água. Transferir volumetricamente 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água para balão volumétrico de 25 mL, completar o volume com solução de carbonato de sódio anidro 29% (p/v) e homogeneizar. Determinar a absorvância em 760 nm ( $A_2$ ) após 30 minutos, utilizando água para ajuste do zero.

*Solução referência:* dissolver, em água, imediatamente antes do uso, 50 mg de pirogalol e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água e homogeneizar. Transferir, volumetricamente, 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água e homogeneizar. Transferir, volumetricamente, 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água para balão volumétrico de 25 mL, completar o volume com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v) e homogeneizar. Determinar a absorvância em 760 nm ( $A_3$ ) após 30 minutos, utilizando água para ajuste do zero.

Calcular o teor de taninos expressos em pirogalol, em porcentagem, segundo a expressão:

$$TT = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

em que,

TT = teor de taninos totais expressos em pirogalol % (p/p);

$A_1$  = absorvância medida para a *Solução amostra para polifenóis totais*;

$A_2$  = absorvância medida para a *Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele*;

$A_3$  = absorvância medida para a *Solução referência*;

$m_1$  = massa em gramas da amostra, considerando a perda por dessecação;

$m_2$  = massa em gramas de pirogalol.

## Catequina

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 280 nm; pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5  $\mu$ m), mantida à temperatura de 23 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,8 mL/minuto.

*Fase móvel (1):* água e ácido fosfórico a 85% (99:1).

*Fase móvel (2):* metanol e ácido fosfórico a 85% (99:1)

Tempo (minutos)	Fase móvel (1) (%)	Fase móvel (2) (%)	Sistema de eluição
0 - 15	70 → 50	30 → 50	gradiente linear
15 - 16	50 → 25	50 → 75	gradiente linear
16 - 17	25 → 70	75 → 30	gradiente linear
17 - 18	70	30	isocrático

*Solução amostra:* pesar 0,750 g da droga pulverizada e transferir para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada. Adicionar 150 mL de água. Aquecer em banho-maria durante 30 minutos, a temperatura de 85 °C a 90 °C. Resfriar em água corrente e transferir para um balão volumétrico de 250 mL. Lavar o balão de fundo redondo transferindo as águas de lavagem com todo conteúdo de droga vegetal para o balão volumétrico. Completar o volume com água. Deixar decantar e filtrar o líquido sobrenadante em papel de filtro. Desprezar os primeiros 50 mL do filtrado.

*Solução referência:* dissolver quantidade exatamente pesada de catequina em água, para obter solução a 4,05 µg/mL.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 20 µL da *Solução referência* e 20 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção da catequina na amostra é de aproximadamente 6,1 minutos. Calcular o teor de catequina, em porcentagem, segundo a expressão:

$$TC = \frac{C_r \times A_a \times FD \times 100}{A_r \times m}$$

em que,

TC = teor de catequina % (p/p);

$C_r$  = concentração da *Solução referência* em g/mL;

$A_r$  = área sob o pico correspondente à catequina na *Solução referência*;

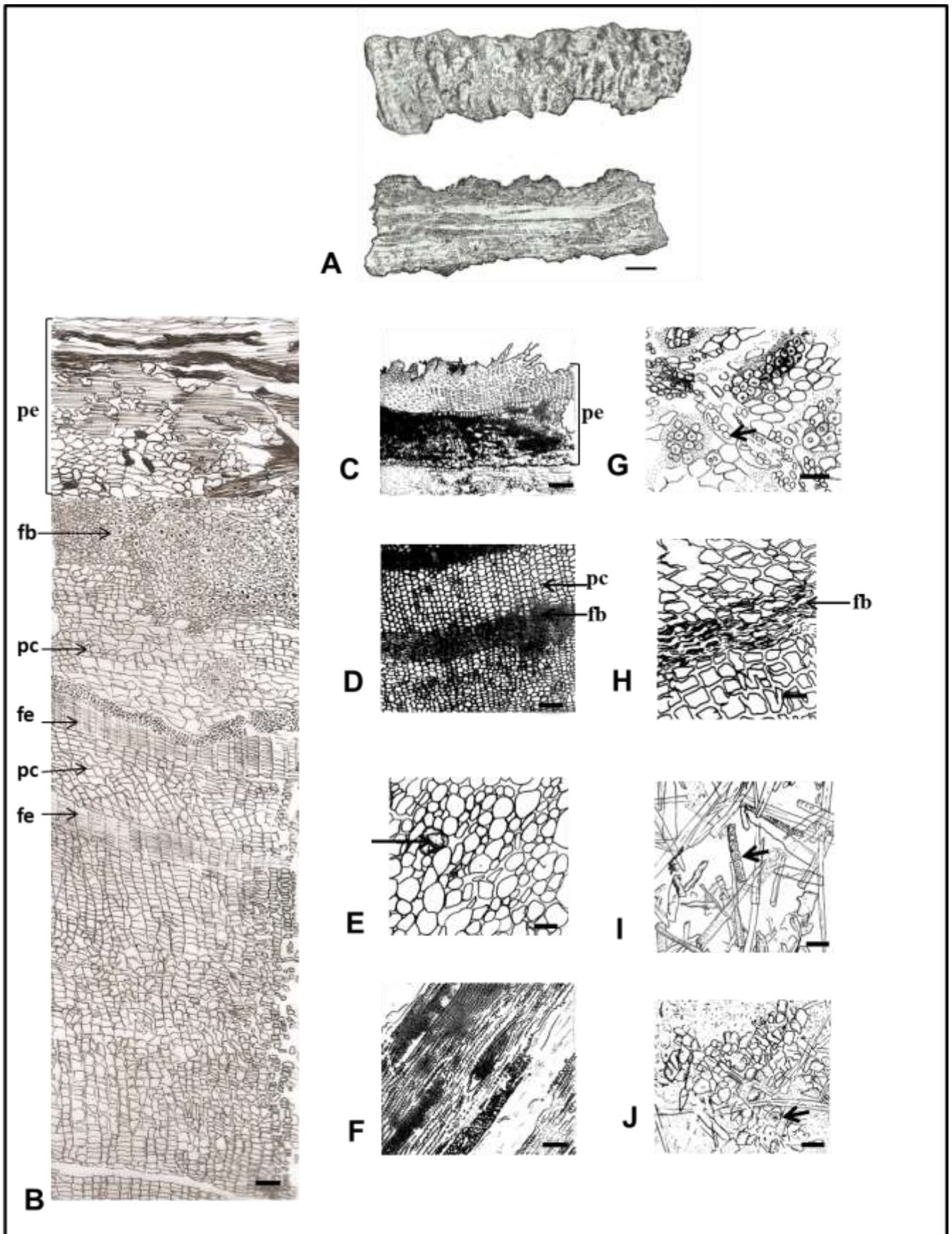
$A_a$  = área sob o pico correspondente à catequina na *Solução amostra*;

$m$  = massa em gramas da amostra, considerando a perda por dessecação;

FD = fator de diluição (250).

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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



**Figura 1** – Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

As escalas correspondem em A a 2 cm; B, C, D, E, F e H a 100  $\mu$ m; G, I e J a 25  $\mu$ m.

A - aspecto geral da casca do caule, em vista frontal e interna, respectivamente. B - detalhe da distribuição dos tecidos do caule, em secção transversal: feloderme (fe), fibras (fb), parênquima cortical (pc), periderme (pe). C - detalhe da secção

transversal da casca: periderme (pe). **D** - detalhe da secção transversal da casca: parênquima cortical (pc) e faixas de fibras (fb). **E** - detalhe da secção transversal da casca: cristal prismático nas células de parênquima cortical (seta). **F** - detalhe da secção longitudinal da casca mostrando um cordão parenquimático e um raio. **G** - detalhe da secção transversal na região dos raios parenquimáticos da casca: grãos de amido nas células de parênquima cortical (seta). **H** - detalhe da secção longitudinal da casca: fibras (fb). **I e J** - detalhes observados no pó. **I** - fibras libríformes e células parenquimáticas com cristais prismáticos (seta). **J** - células pétreas (seta).

## **ANGICO, extrato fluido** *Anadenantherae extracta fluida*

O extrato fluido é obtido a partir de cascas secas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, contendo, no mínimo, 5% de taninos totais e, no mínimo, 0,13% de catequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, 290,27).

### PREPARAÇÃO

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

### CARACTERÍSTICAS

Líquido límpido, de cor castanho-escuro.

### IDENTIFICAÇÃO

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

*Fase estacionária*: sílica-gel F<sub>254</sub> (0,25 mm).

*Fase móvel*: acetato de etila, ácido fórmico e água (90:5:5).

*Solução amostra*: diluir 0,2 mL do extrato fluido para 10 mL de metanol.

*Solução referência*: pesar cerca de 1 mg de catequina e dissolver em 1 mL de metanol.

*Procedimento*: aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra* e 20 µL da *Solução referência*. Desenvolver o cromatograma. Remover a placa e deixar secar ao ar. Nebulizar a placa com vanilina a 1% (p/v) em etanol e, em seguida, nebulizar com ácido clorídrico.

*Resultados*: no esquema abaixo estão representadas as zonas obtidas com a *Solução referência* e a *Solução amostra*. Outras zonas podem ocasionalmente estar presentes.