

## **ESPINHEIRA-SANTA, folha**

### *Mayteni folium*

A droga vegetal consiste de folhas secas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, contendo no mínimo, 2,0% de taninos totais, expressos em pirogalol ( $C_6H_6O_3$  126,11), dos quais, no mínimo, 2,8 mg/g equivalem a epicatequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ , 290,27).

#### IDENTIFICAÇÃO

##### A. Descrição macroscópica

Ramos jovens, quando presentes, glabros, angulosos, com estrias longitudinais. Pecíolo curto, com 0,2 a 0,5 cm de comprimento. Folhas simples, inteiras, ovalado-oblongas à elípticas ou elíptico-lanceoladas; lâmina com 2,1 a 9,0 cm de comprimento, e 1,0 a 3,1 cm de largura, coriáceas a subcoriáceas, glabras, de coloração verde-acinzentada, mais clara na face abaxial; ápice mucronado, base aguda a obtusa. A nervação é penínérvea, craspedódroma mista, com nervuras secundárias partindo em ângulo agudo em relação à principal, terminando na margem da lâmina, ou ramificando-se nas proximidades dela, ou ainda seguindo em direção à margem, onde se reúnem com a superior subsequente, formando arcos. Na margem foliar, tanto as nervuras secundárias quanto as que delas partem, unem-se com a nervura marginal, formando projeções pontiagudas, de 5 a 15 unidades por folha, distribuídas em um ou nos dois lados da lâmina, mais frequentemente, em sua metade apical, sendo sempre uma delas terminal. Aréolas predominantemente retangulares, com terminações ramificadas; margem foliar espessada e amarelada.

##### B. Descrição microscópica

A folha apresenta mesofilo dorsiventral e é hipoestomática, com estômatos laterocíticos, de 1 a 3 células subsidiárias para cada célula-guarda. A epiderme é uniestratificada e recoberta por cutícula espessa que se projeta entre as células, sempre mais proeminente na região da nervura principal, onde ocorrem ornamentações cuticulares na forma de estrias e papilas. As células epidérmicas comuns, em ambas as faces da lâmina, são poligonais, de dimensões variadas, com paredes anticlinais retas, maiores na face adaxial. Nelas estão presentes cristais de oxalato de cálcio, prismáticos retangulares e estiloides pequenos. O parênquima paliçádico é formado por 2 estratos de células longas e finas, em paliçada típica, ou ainda, por 2 a 3 estratos de células cúbicas. O parênquima esponjoso apresenta 6 a 9 estratos de células com expansões braciiformes curtas, mais compactado na face abaxial. No mesofilo são comuns idioblastos fenólicos, isolados ou em grupos, além de cristais estiloides e prismáticos de pequenas dimensões. Na nervura principal, biconvexa em secção transversal, ocorrem 3 a 4 camadas de colênquima angular junto à face adaxial e 2 a 3 na face oposta. O feixe vascular é único, colateral, em arco aberto, circundado por bainha parenquimática, e com calotas de fibras sobre ambos os polos de tecidos condutores. A distribuição dos tecidos nos feixes vasculares pode variar de acordo com a porção da lâmina e o grau de amadurecimento do órgão. O floema apresenta cristais rômnicos de oxalato de cálcio, esclereídes e idioblastos fenólicos. As fibras que o acompanham apresentam parede celular espessada, com pontoações simples. Folhas maduras podem apresentar feixe vascular bicolateral ou concêntrico (anficroival), sempre circundado por esclerênquima. Na margem foliar, o feixe vascular está envolto por 250 a 280 fibras. O pecíolo é circular a plano-convexo, em secção transversal e, em direção à porção distal da folha, ocorrem aletas laterais e uma leve convexidade na porção adaxial. A epiderme é uniestratificada e coberta por cutícula espessa. Nas células epidérmicas e nos estratos subjacentes ocorrem pequenos cristais de oxalato de cálcio ser idioblastos fenólicos. O parênquima colenquimatoso pode conter cristais estiloides prismáticos de pequenas dimensões. Braquiesclereídes isolados ocorrem ao acaso no parênquima fundamental do

pecíolo. O feixe vascular é concêntrico, cilíndrico a levemente côncavo-convexo, circundado por uma bainha esclerenquimática composta por fibras isoladas ou em grupos de 2 a muitos elementos.

### C. Descrição microscópica do pó

O pó atende a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São características: coloração verde-amarelada; fragmentos de epiderme com paredes periclinais retas, recobertas por cutícula espessa e contendo pequenos cristais estiloides ou prismáticos pequenos; fragmentos de epiderme com estômatos laterocíticos; fragmentos de epiderme, em secção transversal, com estômato evidenciando o átrio; fragmentos de parênquima paliádico com 2 ou 3 camadas; fragmentos de bordos foliares com porções de fibras; fragmentos de fibras de grosso calibre com pontoações simples; fragmentos de parênquima com braquiesclereides; fragmentos de parênquima contendo idioblastos fenólicos; fibras isoladas ou conjunto de fibras em vista longitudinal; cristais estiloides ou prismáticos ou rômnicos, isolados; braquiesclereides isolados.

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

*Fase estacionária:* sílica-gel F<sub>254</sub> (0,250 mm).

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

*Solução amostra:* pesar, com exatidão, cerca de 5 g da droga moída, acrescentar 50 mL de água e aquecer, sob refluxo, durante 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, filtrar a solução obtida em algodão, sob pressão reduzida, para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

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

*Procedimento:* aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 10 µL da *Solução amostra* e 3 µL da *Solução referência*. Desenvolver o cromatograma. Remover a placa e deixar secar em capela de exaustão. Examinar sob a luz ultravioleta em 254 nm. A seguir, nebulizar a placa com vanilina sulfúrica SR e aquecer em estufa a 110 °C, durante 10 minutos.

*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	
Epicatequina: zona de coloração bordô	Zona de coloração bordô Zona de coloração bordô
<i>Solução referência</i>	<i>Solução amostra</i>

## TESTES

**Matéria estranha (5.4.1.3).** No máximo 2%.

**Água (5.4.1.4).** No máximo 12%.

**Cinzas totais (5.4.1.5.1).** No máximo 8%.

**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.

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

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

**Índice de espuma.** Transferir, quantitativamente, cerca de 1 g da droga vegetal moída (180 µm), pesada, com exatidão, para erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. Manter sob fervura moderada durante 15 minutos. Resfriar, filtrar em algodão para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume, através do filtro, e homogeneizar. Distribuir o decocto obtido em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em uma série sucessiva de 1 mL, 2 mL, 3 mL, até 10 mL, e ajustar o volume do líquido em cada tubo a 10 mL com água. Tampar os tubos e agitá-los vigorosamente com movimentos verticais durante 15 segundos, com duas agitações por segundo. Deixar em repouso por 15 minutos e medir a altura da espuma. Após, adicionar em cada tubo 1 mL de ácido clorídrico 2 M, se a altura da espuma de todos os tubos for inferior a 1 cm, o índice de espuma é menor que 100. Se, em qualquer um dos tubos, a altura da espuma medida permanecer igual ou superior a 1 cm, a diluição do material vegetal nesse tubo (A) é o índice observado. Calcular o índice de espuma segundo a expressão:

$$IE = \frac{1000}{A}$$

em que,

IE = índice de espuma; e

A = volume em mililitros do decocto usado para preparação da diluição no tubo no qual a espuma foi observada.

O índice de espuma é , no mínimo, 250.

## DOSEAMENTO

### Taninos totais

*Nota: proteger as amostras da luz durante a extração e a diluição. Utilizar água isenta de dióxido de carbono em todas as operações.*

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

*Solução estoque:* pesar 0,750 g da droga pulverizada (250 µm) e transferir para um erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada. Adicionar 150 mL de água. Aquecer em banho-maria durante 30 minutos à temperatura de 60 °C. Resfriar em água corrente e transferir para um balão volumétrico de 250 mL. Lavar o erlenmeyer e transferir as águas de lavagem com todo conteúdo de droga vegetal para o mesmo balão volumétrico. Completar o volume com água e homogeneizar. Deixar decantar e filtrar o líquido sobrenadante em papel de filtro. Desprezar os primeiros 50 mL do filtrado.

*Solução amostra para polifenóis totais:* transferir 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 25 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<sub>1</sub>) após 30 minutos, utilizando água para ajuste do zero.

*Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele:* a 10 mL do filtrado, adicionar 0,1 g de pó de pele e agitar, mecanicamente, em erlenmeyer de 125 mL durante 60 minutos. Filtrar em papel de filtro. Transferir 5 mL desse filtrado para balão volumétrico de 25 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<sub>2</sub>) após 30 minutos, utilizando água para ajuste do zero.

*Solução referência:* dissolver, em água, imediatamente antes do uso 50 mg de pirogalol, transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água e homogeneizar. Transferir, volumetricamente, 5 mL da 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<sub>3</sub>) 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 = taninos totais % (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 utilizada no ensaio, considerando a determinação de água; e

$m_2$  = massa em gramas de pirogalol.

## Epicatequina

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 210 nm; pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm); fluxo da *Fase móvel* de 0,8 mL/minuto.

*Fase móvel (1)*: ácido trifluoracético a 0,05 % (v/v).

*Fase móvel (2)*: ácido trifluoracético a 0,05% (v/v) em acetonitrila.

Tempo (minutos)	<i>Fase móvel (1)</i> %	<i>Fase móvel (2)</i> %	Sistema de eluição
0 – 13	82→75	18→25	gradiente linear
13 – 16	75→66	25→34	gradiente linear
16 – 20	66→58	34→42	gradiente linear
20 – 23	58→35	42→65	gradiente linear
23 – 25	35→82	65→18	gradiente linear
25 – 28	82	18	isocrático

*Solução amostra*: pesar, com exatidão, cerca de 5 g da droga vegetal pulverizada (250 µm) em balão de fundo redondo de 100 mL com boca esmerilhada, adicionar 50 mL de água e levar a refluxo durante 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, filtrar a solução obtida sob pressão reduzida. Extrair o filtrado com três porções de 50 mL de acetato de etila em funil de separação de 250 mL. Para total separação das fases, deixar em repouso à temperatura de -18 °C durante 5 minutos. Reunir as fases orgânicas. Filtrar em papel de filtro contendo 5 g de sulfato de sódio anidro, sob pressão reduzida. Evaporar a fase orgânica em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até resíduo. Suspender o resíduo com 5 mL de mistura de metanol e água (2:8). Extrair em cartucho de extração em fase sólida, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (55 µm, 70 Å), previamente acondicionada com 8 mL de mistura de metanol e água (2:8), para balão de 100 mL. Eluir 10 mL de metanol e água (2:8) para o mesmo balão, completar o volume com metanol e água (2:8) e homogeneizar ( $S_1$ ). Transferir, volumetricamente, 5 mL da  $S_1$  para balão volumétrico 25 mL, completar o volume com metanol e água (1:1) e homogeneizar ( $S_2$ ). Filtrar a  $S_2$  em unidade filtrante de 0,45 µm e injetar no cromatógrafo.

*Solução referência*: dissolver quantidade exatamente pesada de epicatequina em metanol e água (1:1), para obter solução a 0,4 mg/mL.

*Soluções para curva analítica:* diluir alíquotas de 50 µL, 200 µL, 350 µL, 500 µL e 600 µL da *Solução referência* em balão volumétrico de 2 mL, com metanol e água (1:1), para obter concentrações de 10 µg/mL; 40 µg/mL; 70 µg/mL; 100 µg/mL e 120 µg/mL.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 20 µL das *Soluções para curva analítica* e 20 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção relativo é cerca de 8,0 minutos para epicatequina. Determinar o teor de epicatequina na *Solução amostra* a partir da equação linear da reta obtida com a curva analítica do padrão. Calcular o teor de epicatequina, em mg/g da amostra, segundo a expressão:

$$\text{TEC} = \frac{\text{VLR} \times 500}{1000 \times m}$$

em que,

TEC = teor de epicatequina em mg/g;

VLR = concentração em µg/mL de epicatequina/mL na *Solução amostra*, a partir da equação da reta;

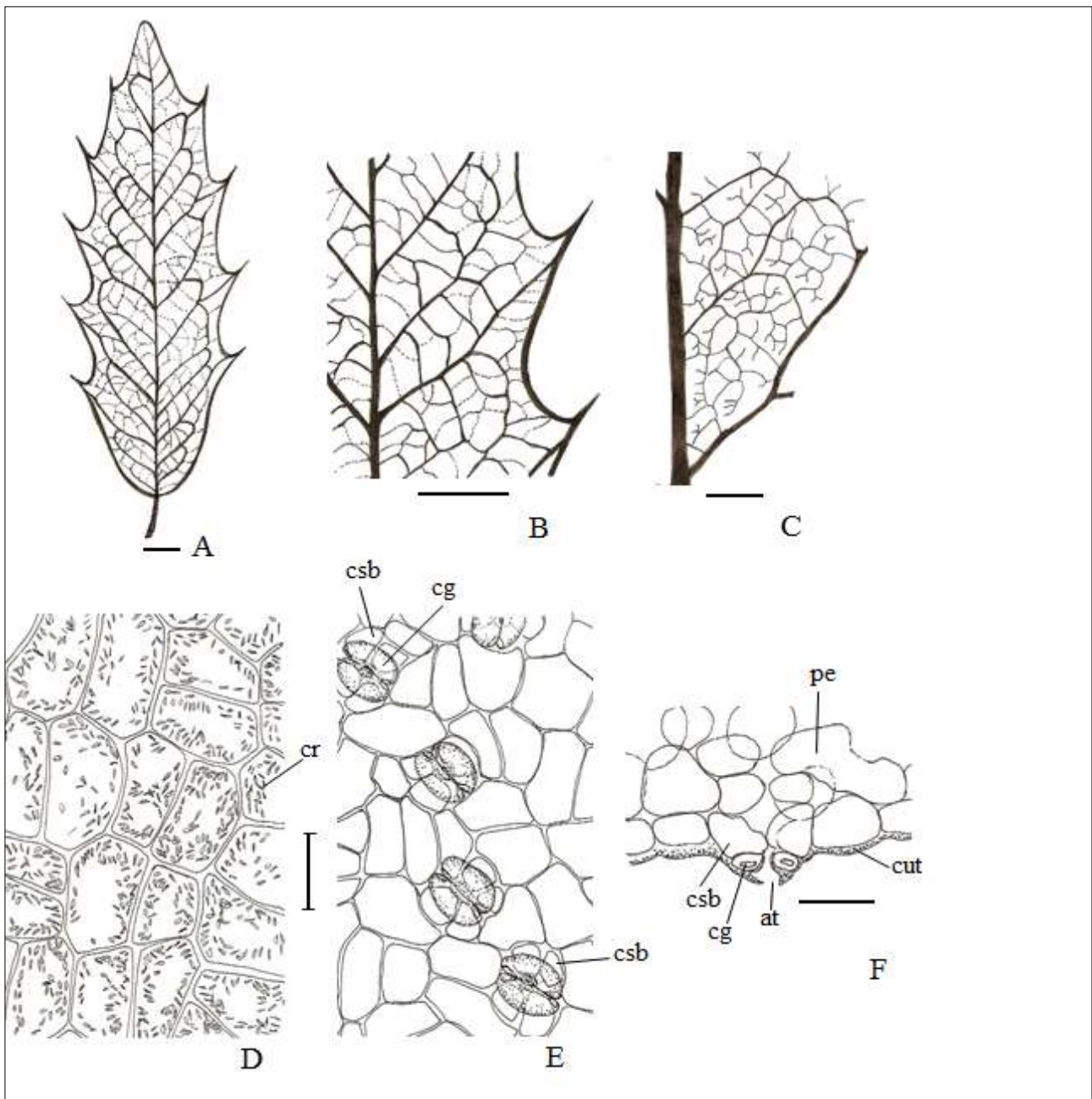
500 = fator de diluição;

1000 = valor de conversão de µg para mg; e

*m* = massa em gramas da amostra, considerando a determinação de água.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

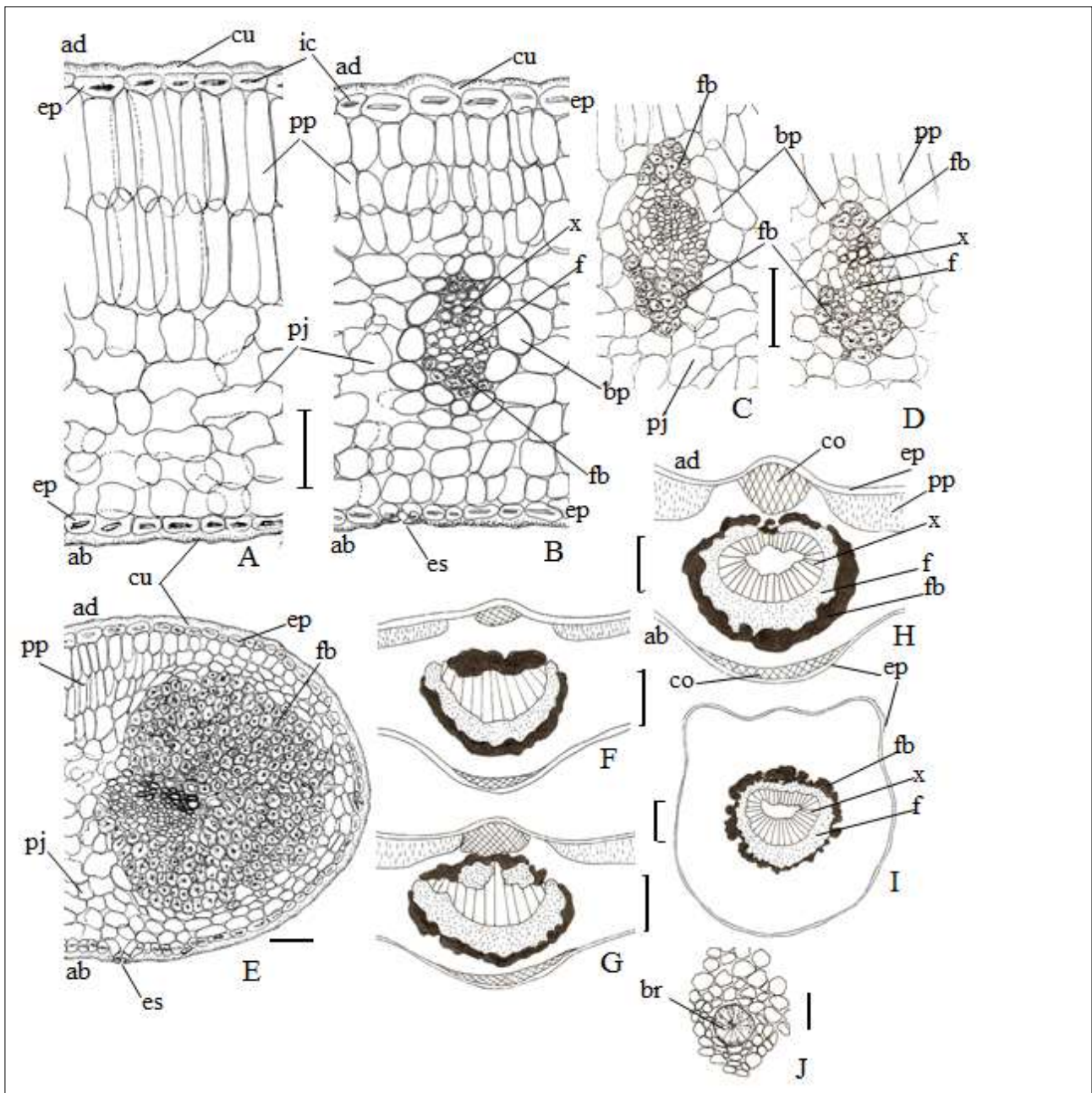
Em recipiente hermeticamente fechado ao abrigo da luz e do calor.



**Figura 1** – Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek

As escalas correspondem em **A** e **B** a 5 mm; em **C** a 1 mm; em **D**, **E** e **F** a 30  $\mu$ m.

**A** – aspecto geral da lâmina foliar. **B** – detalhe da nervação foliar na face adaxial, em vista frontal. **C** – detalhe de porção da lâmina foliar, na face adaxial, em vista frontal, mostrando as aréolas e terminações xilemáticas. **D** e **E** – detalhe parcial da epiderme voltada para a face adaxial e abaxial, respectivamente, em vista frontal: idioblasto cristalífero (ic); célula subsidiária (csb); estômato (es). **F** – detalhe parcial da lâmina foliar, em secção transversal, mostrando um estômato: parênquima esponjoso (pj); cutícula (cu); átrio supra-estomático (at); célula-guarda (cg); célula subsidiária (csb); idioblasto cristalífero (ic).



**Figura 2** – Aspectos microscópicos e microscópicos do pó em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek

As escalas correspondem em **A** e **B** a 50  $\mu\text{m}$ ; em **C** e **D** a 75  $\mu\text{m}$ ; em **E** a 35  $\mu\text{m}$ ; em **F** a 120  $\mu\text{m}$ ; em **G** a 180  $\mu\text{m}$ ; em **H** e **I** a 200 $\mu\text{m}$ ; em **J** a 50  $\mu\text{m}$ .

**A** e **B** – detalhes parciais do mesófilo de amostras distintas, em secções transversais: face adaxial (ad); face abaxial (ab); epiderme (ep); cutícula (cu); idioblasto cristalífero (ic); parênquima paliçádico (pp); parênquima esponjoso (pj); xilema (x); floema (f); bainha parenquimática (bp); fibras (fb); estômato (es). **C** e **D** – detalhe de um feixe vascular secundário na porção basal e na porção mediana da lâmina foliar, respectivamente, em secção transversal: fibras (fb); bainha parenquimática (bp); parênquima esponjoso (pj); parênquima paliçádico (pp); xilema (x); floema (f). **E** – detalhe do bordo foliar, em secção transversal, mostrando a nervura marginal: face adaxial (ad); face abaxial (ab); epiderme (ep); parênquima paliçádico (pp); parênquima esponjoso (pj); fibras (fb); estômato (es). **F**, **G** e **H** – esquemas do aspecto geral da porção mediana da nervura principal, em secções transversais, mostrando variações na distribuição do floema, xilema e fibras: face adaxial (ad); face abaxial (ab); colênquima (co); epiderme (ep); parênquima paliçádico (pp); xilema (x); floema (f); fibras (fb). **I** – esquema do aspecto geral do pecíolo, em secção transversal: epiderme (ep); fibras (fb); xilema (x); floema (f). **J** – detalhe de um braquiesclereíde do pecíolo, em secção transversal: braquiesclereíde (br).