

PITANGUEIRA, folha
Eugeniae folium

A droga vegetal consiste de folhas secas de *Eugenia uniflora* L., contendo, no mínimo, 5,0% de taninos, 1,0% de flavonoides totais, expressos em quercetina; e, 0,8% de óleos voláteis. O óleo volátil é constituído de, no mínimo, 27,0% de curzerenos (*cis* e *trans*).

CARACTERÍSTICAS

As folhas secas apresentam odor cítrico

IDENTIFICAÇÃO

A. Descrição macroscópica

Folhas simples, ovaladas a ovalado-lanceoladas, em geral com 4,5 a 6,2 cm de comprimento e 2 a 2,7 cm de largura, glabras, membranáceas a levemente coriáceas, de coloração verde escuro na face adaxial e verde mais claro na abaxial; lâmina com ápice agudo a acuminado, por vezes levemente falcado, base aguda a obtusa, margem inteira, penínérvea, com nervura principal mais proeminente na face abaxial. Nervação camptódromo-broquidódroma, cada nervura secundária partindo em ângulo agudo em relação à principal, anastomosando-se com sua superior subsequente, de modo a formar uma série de arcos nas proximidades do bordo foliar; as nervuras secundárias e de ordem superior determinam aréolas incompletas, com terminações vasculares livres. Pecíolo com 0,3 a 0,6 cm de comprimento. As glândulas, presentes na lâmina, dificilmente são visualizadas sem auxílio de lentes.

B. Descrição microscópica

Lâmina foliar de simetria dorsiventral, hipoestomática com estômatos paracíticos, cujas células-guarda mostram espessamento da face interna em forma de halteres. Em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas são sinuosas em ambas as faces. Em secção transversal, a lâmina apresenta epiderme uniestratificada, recoberta por cutícula. O parênquima paliçádico é uniestratificado e acompanhado por células coletoras. O parênquima esponjoso possui de sete a nove estratos de células com projeções brachiformes relativamente longas. No mesofilo são comuns idioblastos com cristais rômnicos e com drusas de oxalato de cálcio. Cavidades secretoras, contendo óleo volátil, são comuns subjacentes à epiderme, em ambas as faces foliares, embora mais abundantes na adaxial. Na nervura principal, de contorno plano-convexo, ou raramente côncavo-convexo ou biconvexo, ocorrem, subjacentes à epiderme, uma a três camadas de colênquima anelar. O feixe vascular principal é do tipo biclateral, em arco aberto, envolto por dois a três estratos de células parenquimáticas de paredes espessadas, e uma bainha de fibras, exceto nas extremidades do arco. O floema apresenta abundância de cristais rômnicos de pequenas dimensões. As nervuras secundárias e as de menor calibre são acompanhadas por calotas de fibras em ambos os polos. O pecíolo, de contorno côncavo-convexo, apresenta pequenas expansões laterais. A epiderme é uniestratificada, contendo substâncias de coloração castanha, também presente nas células do parênquima fundamental subjacente, colenquimatoso. Cavidades secretoras, semelhantes às da lâmina, também estão presentes subepidêrmicamente. Grãos de amido, drusas e cristais ocorrem em abundância por todo o parênquima. O feixe vascular configura-se em arco aberto, biclateral, com abundância de cristais rômnicos no floema, envolto por quatro a oito camadas de tecido parenquimático de paredes

espassadas, formando uma bainha perivascular. Fibras, isoladas ou em grupos de dois a três elementos, raramente estão presentes ao redor do feixe vascular.

C. Descrição microscópica do pó

A amostra satisfaz a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São características: fragmentos de epiderme da lâmina com paredes anticlinais sinuosas, sem estômatos; fragmentos de epiderme com estômatos paracíticos, mostrando o espessamento em halteres; fragmentos da lâmina mostrando parênquima paliçádico uniestratificado e/ou parênquima esponjoso com projeções braciiformes relativamente longas; fragmentos da lâmina contendo cristais rômnicos, drusas em abundância e cavidades secretoras de aspecto brilhante devido à presença de óleo volátil; drusas e cristais rômnicos isolados.

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

Fase estacionária: sílica-gel F₂₅₄ (0,250 mm).

Fase móvel: acetato de etila, ácido fórmico e água (75:5:5).

Solução amostra: pesar, com exatidão, cerca de 10 g da droga pulverizada, acrescentar 100 mL de água e aquecer sob refluxo por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, filtrar a solução obtida em algodão, sob pressão reduzida. Extrair a fase aquosa resultante com três porções de 25 mL de acetato de etila em funil de separação de 125 mL. Deixar em repouso em freezer a temperatura de -18 °C durante 15 minutos, para total separação das fases. Reunir e filtrar as frações orgânicas com 5 g de sulfato de sódio anidro. Evaporar a fração orgânica em rotaevaporador sob pressão reduzida até resíduo. Suspender o resíduo com 1 mL de álcool metílico.

Solução referência (1): pesar cerca de 1 mg de epicatequina e dissolver em 2 mL de álcool metílico.

Solução referência (2): pesar cerca de 1 mg de 4'-*O*-metilgalocatequina e dissolver em 1 mL de álcool metílico.

Procedimento: aplicar na cromatoplaca, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra* e 10 µL da *Soluções referência (1)* e 10 µL da *Solução referência (2)*. Desenvolver o cromatograma. Remover a cromatoplaca e deixar secar em capela de exaustão. Nebulizar a placa com solução de cloreto férrico a 1% (p/v) em álcool metílico.

Resultados: no esquema a seguir há as sequências de zonas obtidas com a *Solução referência* e a *Solução amostra*. Outras zonas podem, ocasionalmente, aparecerem.

<i>Parte superior da placa</i>	
4- <i>O</i> -Metilgalocatequina: zona de coloração cinza-azulado Epicatequina: zona de coloração cinza-azulado	Zona de coloração cinza-azulado Zona de coloração cinza-azulado
	Zona de coloração castanho-azulada Zona de coloração castanho-azulada
<i>Solução referência</i>	<i>Solução amostra</i>

E. Para a identificação de curzerenos, proceder conforme descrito em *Cromatografia a gás (5.2.17.5)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector de espectrometria de massas, utilizando mistura de nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (1:1:10) como gases auxiliares; coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com propilenoglicol, com espessura do filme de 0,25 µm. Utilizar hélio a uma pressão de 80 kpa como gás de arraste com fluxo de 1 mL/minuto.

Temperatura:

	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Coluna	0 – 63,33	60 → 250
Injetor		220
Detector		230

Solução amostra: diluir o óleo volátil em éter etílico (2:100).

Procedimento: injetar volume de 1 µL da *Solução amostra* no cromatógrafo a gás, utilizando divisão de fluxo de 1:50. Os isômeros do curzereno devem apresentar tempo de retenção relativo de aproximadamente 1845. Determinar as concentrações relativas por integração manual ou eletrônica pelo método de normalização.

Calcular o Índice de Retenção Relativo (IRR), segundo a expressão:

$$\text{IRR} = 100 \times n + \frac{100 \times (\text{tr}_x - \text{tr}_z)}{(\text{tr}_{z+1} - \text{tr}_z)}$$

em que,

IRR = Índice de Retenção Relativo;

n = número de átomos de carbono do alcano de menor peso molecular;
 tr_x = tempo de retenção do composto “x” (intermediário a tr_z e tr_{z+1});
 tr_z = tempo de retenção do alcano com “n” carbonos;
 tr_{z+1} = tempo de retenção do alcano com “n + 1” carbonos.

TESTES

Matéria estranha (5.4.1.3). No máximo 2,0%.

Perda por dessecação (5.2.9.1). Método gravimétrico. No máximo 10,0%.

Cinzas totais (5.4.1.5.1). No máximo 11,0%.

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 pulverizada (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, até 100 mL 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 por 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 do 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 (IE), segundo a expressão:

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

em que,

IE = índice de espuma;

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

O IE para o decocto deve ser de, no mínimo, 125.

DOSEAMENTO

Taninos totais

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

Solução estoque: pesar, com exatidão, cerca de 0,75 g da droga pulverizada (250 µm) (5.2.11) 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_1) 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 SQR e agitar, mecanicamente, em erlenmeyer de 125 mL durante 60 minutos. Filtrar em papel de filtro. Transferir, volumetricamente, 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_2) 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 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 totais, expressos em pirogalol, em porcentagem, segundo a expressão:

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

em que,

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

A_1 = absorvância da *Solução amostra para polifenóis totais*;

A_2 = absorvância da *Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele*;

A_3 = absorvância da *Solução referência*;

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

m_2 = massa em gramas de pirogalol, considerando a pureza da substância de referência.

Flavonoides totais

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

Solução estoque: pesar, com exatidão, cerca de 0,4 g de droga pulverizada (250 µm) (5.2.11), e transferir para um balão de fundo redondo de 100 mL. Adicionar 1 mL de solução de metenamina a 0,5% (p/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aquecer, sobre manta de aquecimento,

mantendo sob refluxo, por 30 minutos. Filtrar em pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100 mL. Lavar o resíduo da droga e o algodão, no mesmo balão de fundo redondo, com 20 mL acetona. Manter sob refluxo, por 10 minutos, e filtrar em algodão para o mesmo balão volumétrico de 10 mL. Repetir essa operação mais uma vez. Resfriar à temperatura ambiente, completar o volume com acetona e homogeneizar. Transferir 20 mL dessa solução acetônica, para funil de separação (125 mL), 20 mL de água e extrair com uma porção de 15 mL de acetato de etila. Repetir a extração por três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila. Reunir as fases acetato de etila e lavar em funil de separação com duas porções de 50 mL de água. Transferir a fase de acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com acetato de etila e homogeneizar.

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

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

Procedimento: medir a absorvância da *Solução amostra* a 425 nm, em cubeta com 1 cm de espessura, 30 minutos após seu preparo, utilizando a *Solução branco* para ajuste do zero. Calcular o teor de flavonoides totais, expressos em quercetina, na amostra, em porcentagem, segundo a expressão:

$$TQ = \frac{A \times 625}{m \times 500}$$

em que,

TQ = teor de flavonoides totais expressos em quercetina % (p/p);

A = absorvância medida para a *Solução amostra*;

625 = fator de diluição;

500 = coeficiente de absorção específica da quercetina;

m = massa em gramas da amostra utilizada, considerando a perda por dessecação.

Óleos voláteis

Proceder conforme descrito em *Determinação de óleos voláteis em drogas vegetais (5.4.1.6)*. Utilizar balão de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada como líquido de destilação e 0,5 mL de xileno, no tubo graduado. Utilizar planta seca rasurada e não contundida. Proceder à determinação de óleo volátil, a partir de 100 g da droga rasurada. Destilar durante quatro horas. Medir o volume e expressar o rendimento por 100 g de droga (v/p).

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

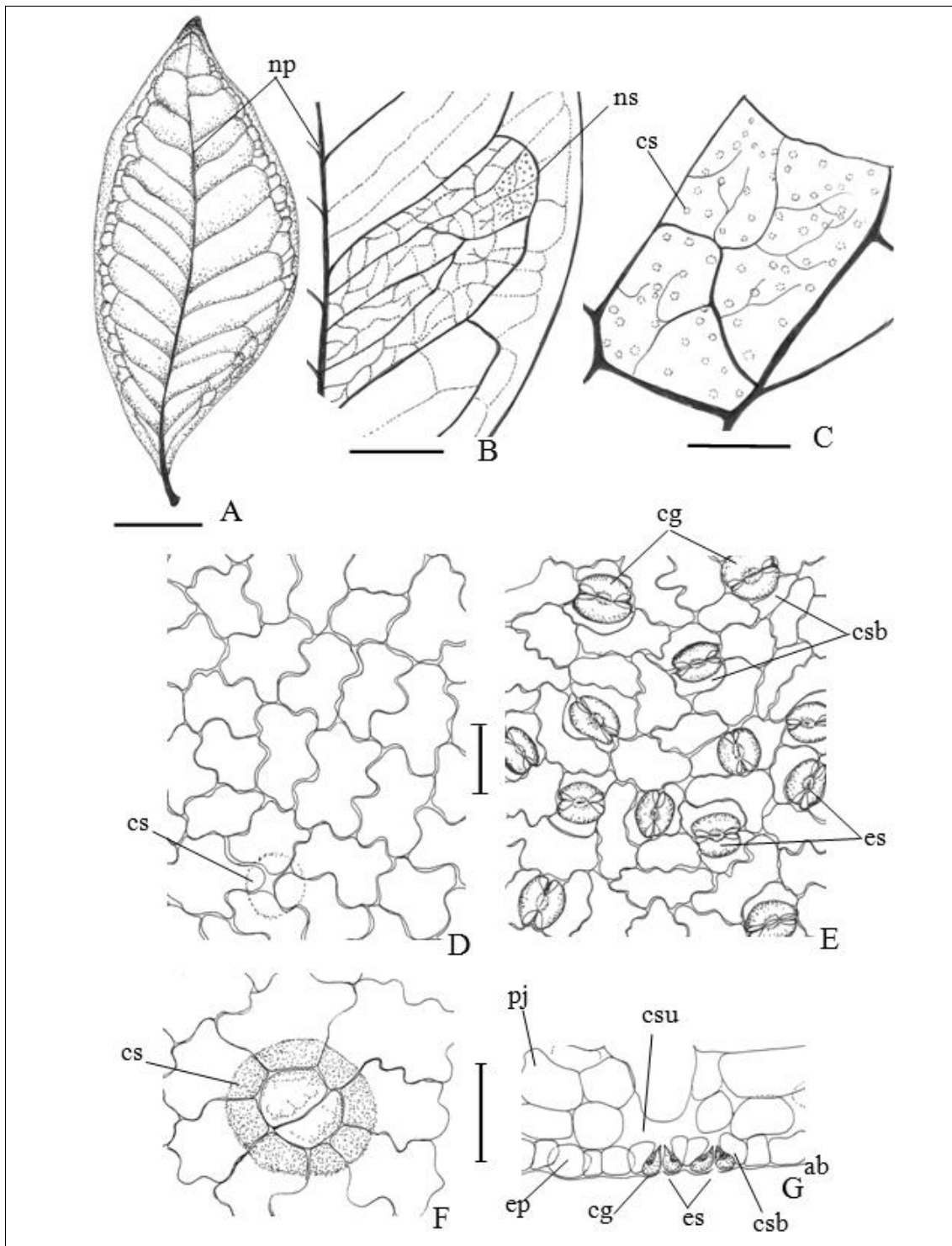


Figura 1 – Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Eugenia uniflora* L.

As escalas correspondem em **A** a 1 cm; em **B** a 5 mm; em **C** a 1 mm; em **D**, **E**, **F** e **G** a 50 μ m.

A – representação esquemática da folha, em vista frontal: nervura principal (np). **B** – detalhe esquemático de porção da lâmina mostrando a nervação foliar: nervura principal (np); nervura secundária (ns). **C** – detalhe esquemático de aréolas e terminações vasculares: cavidade secretora (cs). **D** e **E** – detalhes parciais da face adaxial e abaxial da lâmina foliar, respectivamente, em vista frontal: cavidade secretora (cs); célula-guarda (cg); célula subsidiária (csb); estômato (es). **F** – detalhe parcial da face adaxial da lâmina foliar, em vista frontal, mostrando uma cavidade secretora visualizada por transparência: estômato (es). **G** – detalhe parcial da lâmina, em secção transversal, mostrando complexos estomáticos geminados: parênquima esponjoso (pj); câmara subestomática (csu); face abaxial (ab); célula subsidiária (csb); estômato (es); célula-guarda (cg); epiderme (ep).

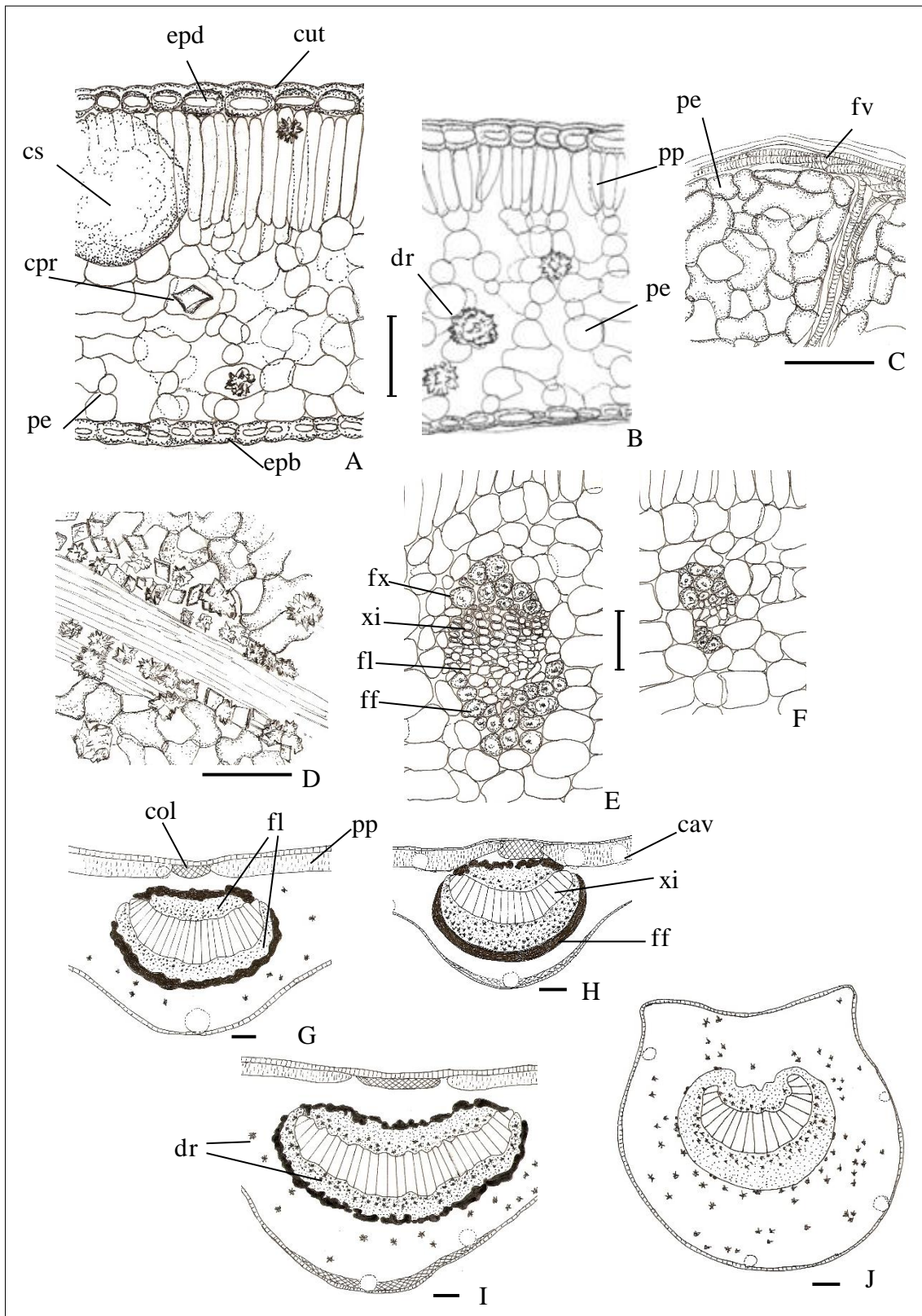


Figura 2 – Aspectos microscópicos e microscópicos do pó em *Eugenia uniflora* L.

As escalas correspondem em **A e B** a 100 μm ; em **C, D, E e F** a 50 μm ; em **G, H e I** a 100 μm ; em **J** a 200 μm .

A e B – detalhes parciais do mesófilo de diferentes amostras, em secções transversais: face abaxial (ab); epiderme (ep); cutícula (cu); cavidade secretora (cs); idioblasto cristalífero (ic); parênquima esponjoso (pj); parênquima paliádico (pp); espaço intercelular (ei). **C e D** – fragmentos do pó mostrando detalhes do parênquima esponjoso: parênquima esponjoso (pj); espaço intercelular (ei); feixe vascular (fv); idioblasto cristalífero (ic). **E e F** – detalhes parciais, em secções transversais, de uma nervura secundária e uma terciária, respectivamente: parênquima paliádico (pp); fibras do xilema (fx); xilema (xi); floema (f); fibras do floema (ff); parênquima esponjoso (pj). **G, H e I** – diagramas da nervura principal, em secções transversais, nas regiões mediana (**G**) e basal de diferentes amostras (**H e I**): face abaxial

(ab); face adaxial (ad); epiderme (ep); xilema (x); colênquima (co); floema (f); parênquima paliçádico (pp); fibras do floema (ff); idioblasto cristalífero (ic); cavidade secretora (cs). **J** – diagrama, em secção transversal, do pecíolo: face abaxial (ab); face adaxial (ad); cavidade secretora (cs); epiderme (ep); floema (f); idioblasto cristalífero (ic); xilema (x).