

TLC PARA ANÁLISE DE DROGAS HERBÁCEAS REVISÃO CRÍTICA DO STATUS E PROPOSTA PARA O APERFEIÇOAMENTO DAS MONOGRAFIAS

Pesquisadores responsáveis:

Eike Reich^{*11}

Chefe do Laboratório de Aplicações
CAMAG-Laboratory, Sonnenmattstrasse 11, 4132 Muttenz,
Switzerland; Eike.Reich@camag.ch

Anne Blatter

Cientista

CAMAG-Laboratory, Sonnenmattstrasse 11, 4132 Muttenz,
Switzerland; Anne.Blatter@camag.com

Beat Meier

Presidente do Comitê Suíço Especializado em Fitoquímica,
Zeller AG, Seeblickstrasse 4, 590 Romanshorn, Switzerland

Samára Milano^{}**

Gerente de Produto; Micronal S. A., Rua João Rodrigues Machado,
25, São Paulo, SP, Brasil, samaram@micronal.com.br

*autor para correspondência do artigo original

** contato para correspondência no Brasil; responsável pela tradução para o português do artigo original - TLC for Analysis of Herbal Drugs

RESUMO

A Cromatografia em Camada Delgada (TLC) é bastante adequada para a análise de plantas medicinais. A flexibilidade insuperável, devido a um grande número de parâmetros que podem influenciar o resultado da cromatografia, é uma das vantagens inerentes do método. Por outro lado, sem a padronização e a definição precisa desses parâmetros, os resultados da TLC são difíceis de reproduzir. Na forma como são atualmente apresentados na Farmacopéia Européia (Ph. Eur.), os recursos de última geração da moderna TLC são amplamente ignorados.

O trabalho a seguir é uma tentativa de destacar os possíveis melhoramentos nas descrições gerais do método, assim como nas monografias individuais. O enfoque é na otimização e padronização dos detalhes experimentais que podem ajudar a aumentar a reprodutibilidade do método. Com base nas discussões teóricas dos parâmetros individuais e vários exemplos práticos, as vantagens da HPTLC (TLC de alto desempenho) são ilustradas e a necessidade de uma abordagem padronizada da metodologia da TLC em novas monografias da farmacopéia é explicada.

Palavras chave: derivatização, documentação, padronização, cromatografia em camada delgada de alto desempenho, metodologia, desenvolvimento da placa, aplicação da amostra, padronização, cromatografia de camada delgada.

INTRODUÇÃO

A TLC tem sido tradicionalmente e amplamente usada para a análise de plantas medicinais, sendo incluída como um método de identificação em monografias de drogas herbáceas na maioria das farmacopéias em todo o mundo.

As descrições gerais do método da TLC são geralmente inespecíficas e deixam muita margem para decisões individuais. Desse modo, os resultados obtidos com tais métodos podem variar consideravelmente e pode ser difícil julgar. A reprodutibilidade obtida com análises por TLC geralmente não é satisfatória devido aos vários parâmetros que influenciam o resultado da cromatografia serem negligenciados. Há considerável resistência contra qualquer modernização da metodologia. Conseqüentemente, a tendência geral observada é considerar a TLC como uma técnica desatualizada e antiga, que deve ser substituída pela “mais confiável” Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) ou outras técnicas cromatográficas.

Ainda assim, a TLC oferece uma série de vantagens que não devem ser subestimadas. Não só para a identificação de drogas herbáceas, mas também para o teste de estabilidade de extratos e produtos acabados, assim como durante o controle em processo na fabricação, a possibilidade de apresentar o resultado cromatográfico na forma de imagem não pode ser substituída [1]. A rápida análise e baixo custo por amostra são benefícios adicionais.

Um requisito principal para aumentar o reconhecimento e a aceitação da TLC como um método analítico competitivo e de ponta é a implementação conseqüente de uma metodologia moderna padronizada, que deve ser aplicada às novas monografias. Este trabalho apresenta aspectos fundamentais da TLC e considerações práticas, essenciais para alcançar a meta. Ele deve ser considerado como um convite para a discussão construtiva do tópico.

ESTADO DA TLC NAS FARMACOPÉIAS

Na Ph. Eur., a TLC é mencionada como uma ferramenta primária para a identificação como parte das monografias sobre todas as plantas medicinais, a maioria dos extratos e várias drogas sintéticas. Para esta última, é observada a tendência de eliminar a TLC nas monografias novas e revisadas, particularmente como uma ferramenta para a detecção de impurezas.

Embora a seção do método geral descreva a TLC em um nível mais avançado do que qualquer outra farmacopéia, a metodologia de ponta e os benefícios da tecnologia de hoje ainda não são refletidos. Somente o uso de placas de TLC pré-revestidas é permitido, mas nenhuma distinção clara é feita entre as camadas da TLC e da HPTLC e nenhuma preferência é dada a qualquer uma delas. Falta a orientação referente a vários detalhes experimentais importantes (aplicação da amostra, desenvolvimento do cromatograma, derivatização) e a vantagem mais importante da TLC, a possibilidade de apresentar resultados cromatográficos qualitativos na forma de imagem nem mesmo é mencionada.

Embora ela seja descrita como um método quantitativo na seção geral, existem poucas monografias caracterizando a TLC quantitativa. Todas as análises devem ser feitas por HPLC e até mesmo para fins de identificação a TLC tem sido substituída sucessivamente por outras técnicas.

A situação corrente poderia ser facilmente mudada, se uma nova abordagem à moderna TLC fosse tomada.

PROPOSTAS PARA OS MELHORAMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Materiais e especificações das placas

Ao final da década de 70, os adsorventes da HPTLC foram introduzidos no mercado. Eles são caracterizados por um tamanho de partícula médio menor (5 μm) e uma estreita distribuição de tamanho (2-10 μm). As camadas da HPTLC

são mais homogêneas, têm uma superfície mais lisa e um poder de separação maior do que as placas de TLC convencionais.

A Tabela 1 compara ambos os tipos.

	TLC	HPTLC
Distribuição do tamanho das partículas [μm]	2 – 40	2 – 10
Tamanho médio das partículas [μm]	10 – 15	5
Espessura das camadas [μm]	250	100, 200
Distância da separação [mm]	100 – 150	30 – 70
Distância ideal da separação [mm]	120	60
Tempo de corrida para a distância ideal da separação [min]	30 – 60	7 – 20
Consumo de Solvente (cuba bipartida) [mL]	25 – 50 (20x20 cm)	10 – 20 (20x10 cm) 5 – 10 (10x10 cm)
Limite de detecção, absorvância [ng]	100 – 1000	10 – 100
Limite de detecção, fluorescência [ng]	1 – 100	0,1 – 10
Comparação de preços por placa (base de vidro) normalizada: placa TLC 20x20 = 1	1 (20x20 cm)	1,2 (20x10 cm) 0,8 (10x10 cm)

Tabela 1: Comparação dos materiais das placas

Pode-se presumir que nos métodos farmacopéicos que prescrevem o uso de placas de TLC, estas placas podem ser substituídas pelo material da HPTLC. O cromatograma resultante mostrará tipicamente uma resolução melhorada, menos alargamento da banda e melhor reprodutibilidade através da placa. O Comitê Suíço Especializado em Fitoquímica verificou esta afirmação para vários métodos publicados na Pharmeuropa para comentário. Por exemplo, a Figura 1 compara a separação do óleo de laranja doce e amargo em ambas as qualidades das fases estacionárias. Pode-se concluir que o uso das placas de HPTLC é a melhor e mais econômica escolha.

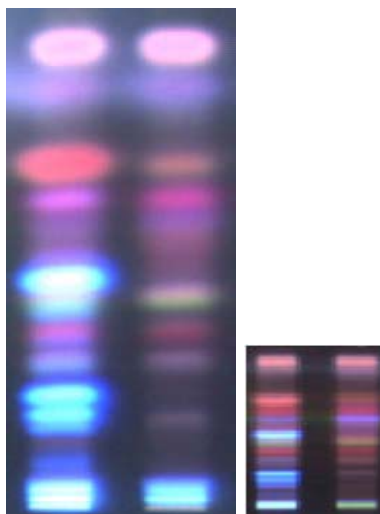


Figura 1 – Separação do óleo de laranja doce (track esquerdo) e amargo (track direito) nas placas de TLC e HPTLC. O desenvolvimento da placa de TLC (esquerda) em 15 cm requer 45 min., a separação em 5 cm no material de HPTLC (direita) é conseguida em 7 min. Fase móvel: etil acetato, tolueno (15,85 V/V), visualização a 366 nm após derivatização com reagente anisaldeído. Nota: Todos os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas bipartidas saturadas. Embora não seja permitido especificar nomes de marcas nas monografias, deve ser observado que as placas de diferentes fabricantes podem variar significativamente com relação ao resultado obtido com um método específico, embora ainda passem no teste de adequabilidade do sistema dado na seção de reagentes da farmacopéia (Figura 2).

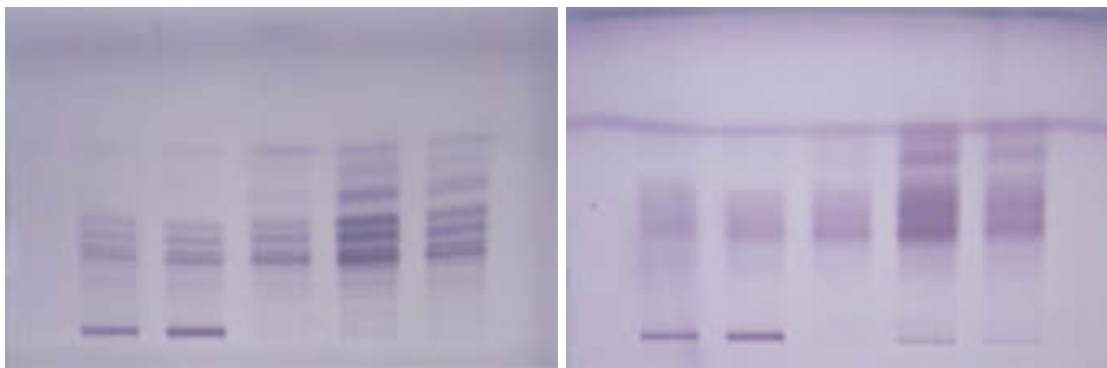


Figura 2 – Separação de várias amostras de Actéia Negra (*Cimicifuga racemosa*) nas placas de HPTLC Si 60 F254 de diferentes fabricantes (esquerda: Merck, direita: Macherey&Nagel). Cortesia das imagens da E.

Flachsmann AG, Zürich.

Devido a não ser viável delinear um único teste que avalie o comportamento da fase estacionária para todos os possíveis problemas de separação, o fabricante da placa deve ser especificado na descrição do método. Alternativamente, um teste de desempenho específico (teste de adequabilidade do sistema) pode ser incluído. Conforme estipulado pelo Guia Técnico para a Elaboração de Monografias [2], essa declaração já é exibida para o trabalho de desenvolvimento submetido à Pharmedeuropa. No entanto, não parece prático incluir mais de um material de placa no desenvolvimento do método antes da finalização da monografia, nem faz sentido incluir outros materiais em um teste durante a validação do método, a menos que esse trabalho seja abrangente. Um meio-termo aceitável levando também em consideração as implicações legais deve ser desenvolvido.

3.2 Aplicação da amostra

Todas as identificações na TLC são primariamente baseadas na comparação das distâncias de migração (valores de R_f). A qualidade da análise, portanto, depende do posicionamento correto da amostra. Para a avaliação quantitativa, o volume de amostra aplicado deve também ser definido e reprodutível. Além disso, a qualidade da separação depende do tamanho, forma e homogeneidade das zonas de aplicação.

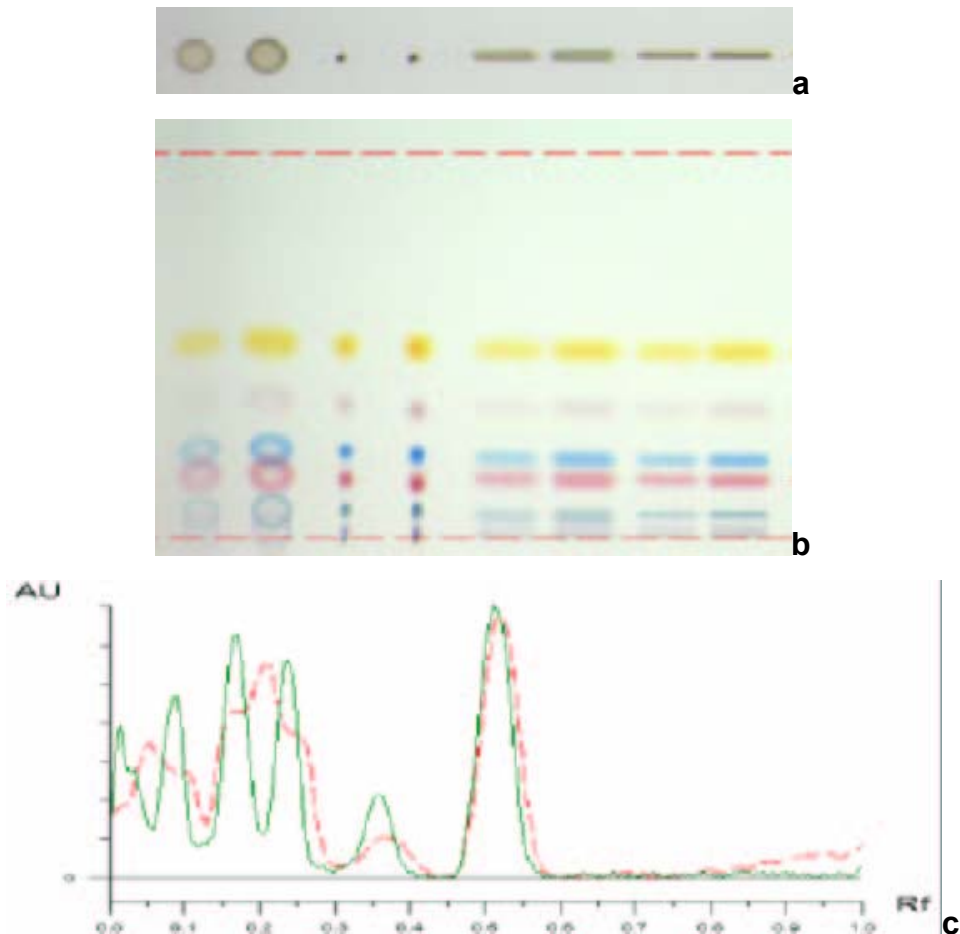
As duas soluções técnicas principais para a transferência da amostra para a placa são a aplicação de pontos por contato (spot) e a pulverização (spray).

Durante a aplicação de pontos, o solvente da amostra executa a “cromatografia circular”, que pode causar a distribuição irregular dos componentes da amostra através dos pontos (Figura 3a). Após o desenvolvimento do cromatograma, as manchas podem ficar largas e não-simétricas. Este pode ser um problema particular se a amostra for dissolvida em um solvente forte.

Os limites de resolução e detecção de um determinado sistema de TLC podem ser significativamente melhorados usando a técnica de pulverização (spray).

Deste modo, qualquer cromatografia durante a aplicação pode ser evitada. Também é possível aplicar grandes volumes de amostras com baixa concentração de analíticos sem perder a qualidade da separação.

Se as amostras forem aplicadas em bandas estreitas, a impressão visual do cromatograma é melhorada. Se essas bandas forem pulverizadas, consegue-se adicionalmente uma distribuição homogênea da amostra por toda a extensão da banda. Esta é a base para a avaliação quantitativa confiável e reproduzível. Deve ser observado que a criação de uma faixa através da aplicação de pontos bem pequenos lado a lado ou o uso das chamadas zonas de concentração não conseguirá a mesma resolução e as zonas na faixa de Rf mais baixa ficarão alteradas (Figura 3b-d).



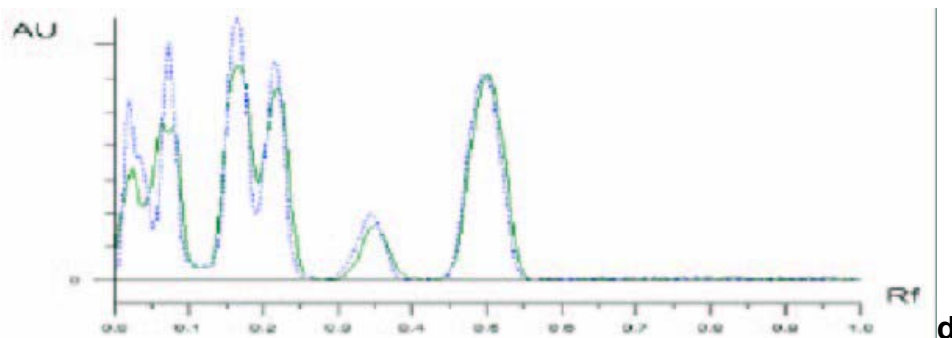


Figura 3 – Influência das diferentes técnicas de aplicação sobre a resolução de uma mistura de corante de teste em metanol (5 μ L e 10 μ L cada) em HPTLC de sílica gel 60. Fase Móvel: tolueno. Da esquerda para a direita: ponto por contato, ponto pulverizado, banda de contato e banda pulverizada; a) Posição da aplicação antes da cromatografia; b) Separação da mistura de corante; c) Comparação do ponto de contato (track 1, linha pontilhada) com o ponto pulverizado (track 3, linha sólida); d) Comparação da banda de contato (track 5, linha sólida) com a banda pulverizada (track 7, linha pontilhada)

3.3 Desenvolvimento

O resultado do cromatograma da TLC (posição, formato e resolução das bandas) depende do tipo e saturação da cuba de desenvolvimento, como pode ser visto na Figura 4. Portanto, um método só é reproduzível para uma cuba específica em uma configuração definida e geralmente não funcionará em um sistema diferente, sem adaptação. A teoria correspondente é descrita em outros lugares [3, 4, 5]. Normalmente, uma configuração saturada (tanque ou cuba horizontal) oferece a mais alta reprodutibilidade, embora as zonas do cromatograma sejam geralmente mais difusas do que em cubas insaturadas ou em sanduíche.

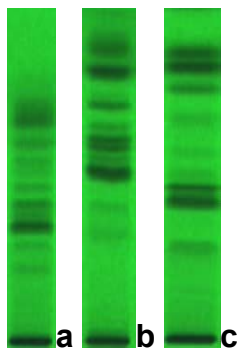


Figura 4 – Cromatograma de framboesas Schisandra desenvolvido em uma cuba bipartida em a) modo saturado; b) modo insaturado; c) em uma Cuba de Desenvolvimento Horizontal em configuração sanduíche. Fase móvel: ácido acético, etil acetato, tolueno (3:33:70 V/V/V), visualização a 254nm.

Na TLC, a velocidade da fase móvel é decrescente durante o desenvolvimento (Figura 5). Devido à maior resistência contra o fluxo da fase móvel de uma fase estacionária densamente envolvida com partículas finas, somente curtas distâncias de desenvolvimento podem ser utilizadas nas placas de HPTLC.

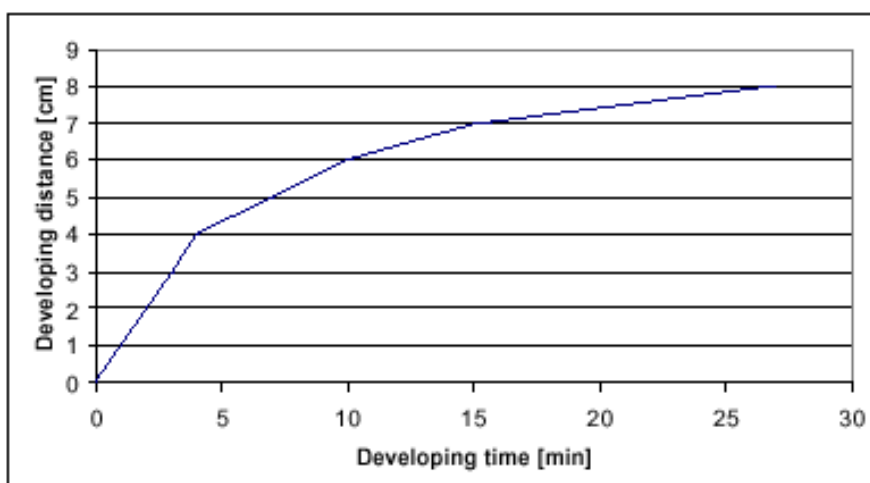


Figura 5 – Relação da distância do desenvolvimento e do tempo de desenvolvimento em HPTLC de sílica gel 60 (valores experimentais). Fase móvel: etil acetato, tolueno (5:95 V/V).

Em uma determinada cuba, mantendo todos os outros parâmetros constantes, a resolução (R_s) de 2 compostos depende tanto de sua posição relativa no cromatograma (R_f) como da distância de migração da frente (distância do desenvolvimento).

A Figura 6 mostra os gráficos da resolução entre 2 componentes em um sistema HPTLC com seletividade assumida (α) de 1,5 em relação à distância da separação. A resolução foi calculada usando a equação (3, p.666):

$$R_s = 1/4(\alpha - 1)(R_f N)^{1/2}(1 - R_f).$$

Nas placas de HPTLC, a melhor resolução é obtida a uma distância de desenvolvimento de 5 - 7 cm, com um máximo a 6 cm. Para a maioria das fases móveis em sílica gel, o desenvolvimento requer 7 - 20 min. Dentro de um determinado cromatograma a separação é melhor na faixa de R_f de 0,3 - 0,4. Portanto, a força do solvente da fase móvel deve ser ajustada para que um par crítico da substância seja posicionado nesta faixa.

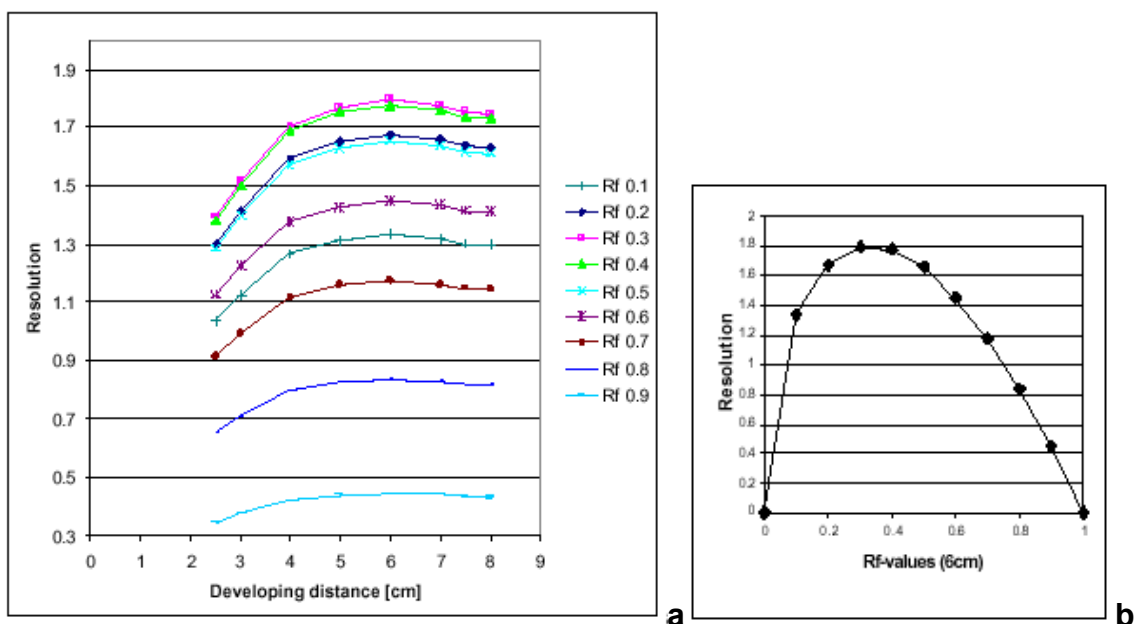


Figura 6 – Influência da distância do desenvolvimento (a) e valores de R_f (b) sobre a resolução: $R_s = 1/4(\alpha - 1)(R_f N)^{1/2}(1 - R_f)$, seletividade (α) 1.5, números de placas (N) tirados de [3, página 666]

Essas previsões teóricas podem ser facilmente comprovadas experimentalmente. Na Figura 7, é apresentada a separação do óleo de camomila em HPTLC de sílica gel. Com base no par de substâncias em R_f 0,4 – 0,5 (seta) nos cromatogramas da Figura 7a, a resolução parece aumentar conforme a distância do desenvolvimento é estendida. No entanto, se os cromatogramas forem colocados na mesma escala (Figura 7b), observa-se que a posição relativa dos 2 componentes não muda, A resolução ainda vai até um máximo de 6 cm de distância de desenvolvimento. Geralmente, os valores de R_f

diminuem com a extensão da distância do desenvolvimento. Este efeito pode ser explicado com a carga aumentada da placa com componentes voláteis do solvente de desenvolvimento. A impressão visual pode ser suportada por comparação das curvas análogas na mesma escala (Figura 7c).

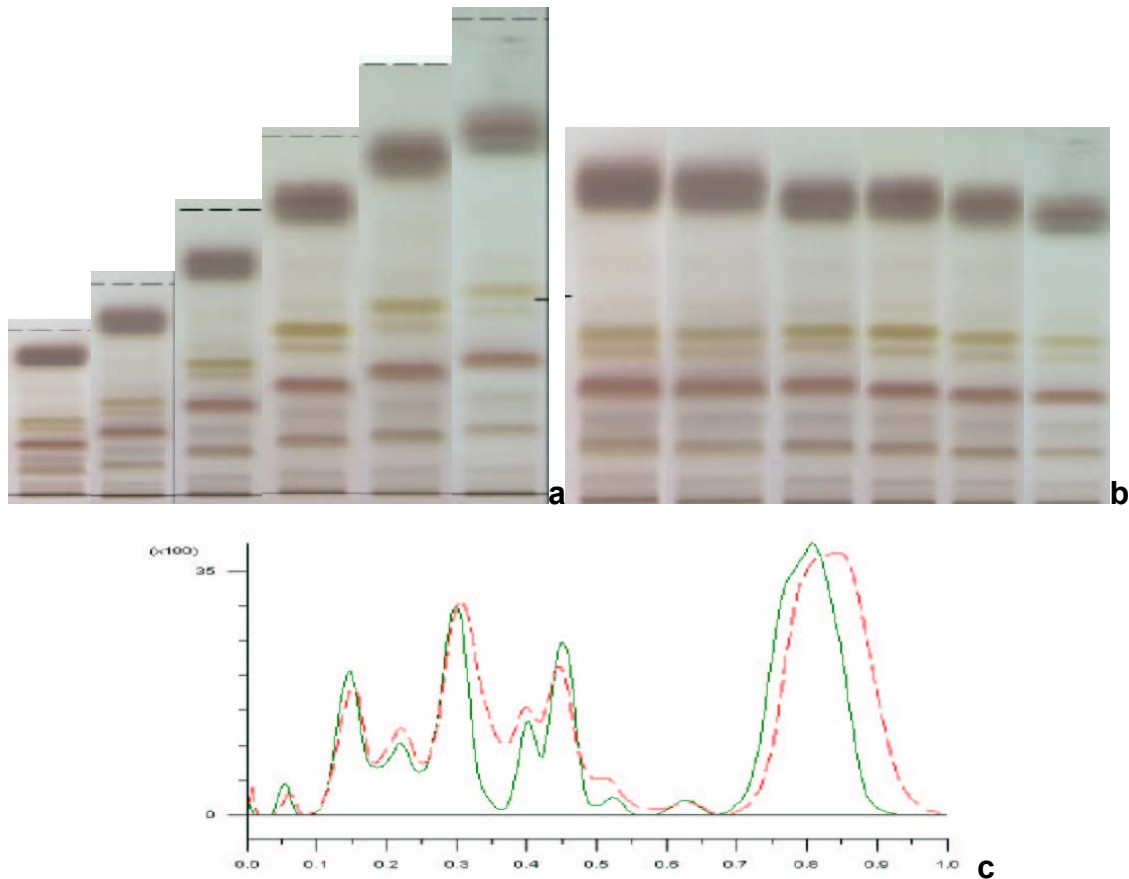


Figura 7 – Separação do óleo de camomila em HPTLC de sílica gel 60. Fase móvel: etil acetato, tolueno (5:95 V/V), derivatização por imersão em ácido sulfúrico a 10% em metanol. a) Distância crescente do desenvolvimento (3-8 cm); b) Cromatogramas de a) escalonado até a altura do track 4 (distância do desenvolvimento de 6 cm); c) Curvas análogas dos cromatogramas na distância de desenvolvimento de 4 cm (tracejada) e 6 cm (sólida)

3.4 Derivatização

A derivatização química para visualizar o resultado cromatográfico ou para melhorar a detectabilidade pode ser realizada em TLC sem operações

complicadas. Os reagentes de derivatização mais comuns são usados na solução. A placa de desenvolvimento é pulverizada ou mergulhada nessa solução. Embora quase exclusivamente mencionada nas monografias, a pulverização é muito difícil de padronizar a menos que sejam empregados dispositivos sofisticados. A pulverização requer grande habilidade. A quantidade de reagente transferido para a placa, assim como a homogeneidade da cobertura dificilmente podem ser descritos precisamente em um método. Isto torna quase impossível reproduzir o procedimento com exatidão. Uma outra desvantagem da pulverização é a geração de vapores perigosos.

A derivatização por imersão da placa no reagente é muito mais fácil de realizar e de controlar. A concentração do reagente, assim como a velocidade e tempo da imersão podem ser especificados, assegurando assim resultados reproduzíveis. A cobertura da placa é sempre homogênea, permitindo a avaliação quantitativa confiável. Nenhum vapor do reagente é produzido.

Em geral, a derivatização química inclui também uma etapa de aquecimento, que deve ser descrita precisamente no método. Por exemplo, “Aqueça a uma temperatura especificada por x minutos ou até aparecer a cor” não é uma afirmação suficiente para assegurar resultados reproduzíveis.

É óbvio que na seção do método geral, a derivatização não pode ser descrita em detalhes, no entanto, cada monografia deve definir esta etapa com precisão. Os parâmetros, que também têm que ser especificados, incluem o tratamento da placa de desenvolvimento antes da derivatização, as condições da secagem da placa após a imersão no reagente e os tempos de espera antes e após uma etapa de aquecimento necessária. A Figura 8 examina os efeitos de vários detalhes experimentais durante a derivatização do extrato de *Hypericum* com reagente de Produtos Naturais (NP)/polietilenoglicol (PEG) em seguida à cromatografia em HPTLC de sílica gel 60.

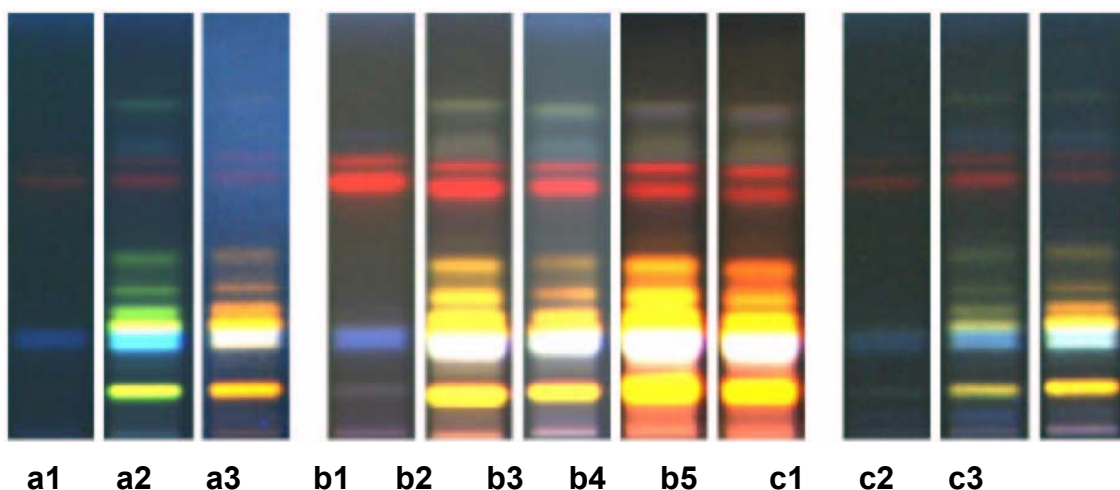


Figura 8 – Efeitos dos detalhes experimentais sobre o resultado da derivatização do extrato de *Hypericum* após a separação em HPTLC de sílica gel 60. Fase móvel: etil acetato, diclorometano, ácido fórmico, ácido acético, água (100:25:10:10:11 v/v/v/v/v), detecção a 366 nm. a): secagem da placa desenvolvida por 3 min com ar frio (a1:antes da derivatização, a2: NP, a3: NP/PEG); b) secagem da placa desenvolvida por 5 min a 105°C (b1: antes da derivatização, b2: NP, b3: NP após 30 min, b4: NP/PEG, b5: NP/PEG após 30 min); c) secagem da placa desenvolvida por 30 min a 105°C (c1:antes da derivatização, c2: NP, c3: NP/PEG)

3.5 Documentação

Uma característica exclusiva da TLC, colocando a técnica à parte de todos os outros métodos cromatográficos, é a disponibilidade das imagens que apresentam e comunicam o resultado cromatográfico. As imagens eletrônicas de hoje dos cromatogramas da TLC podem ser convenientemente geradas usando vídeo ou câmeras digitais ou até scanners de mesa.

A descrição verbal dos cromatogramas da TLC nas farmacopéias correntes não é suficiente para fornecer uma avaliação completa, detalhada e objetiva do resultado. Por exemplo, o resultado do teste de identificação para óleo de anis (cobre também o óleo de anis estrela) é descrito na Ph. Eur. [6]. Sob UV a 254 nm, a amostra apresenta 2 manchas correspondentes ao anisaldeído e ao anetol. Após a derivatização com vanilina, sob luz branca, a amostra apresenta

manchas correspondentes ao linalol e ao anetol, havendo um mancha violeta próximo ao front do solvente. Além disso, a *Pimpinella anisum* pode apresentar uma mancha marrom acima do anisaldeído.

Embora um tanto melhorada por dar uma impressão melhor sobre as posições relativas, a apresentação dos resultados na forma de uma tabela (Tabela 2) usada pela Pharmeduropa, ainda não é uma alternativa adequada para uma imagem do cromatograma como mostra a Figura 9.

Tabela 2: Descrição do resultado cromatográfico em uma tabela para a identificação no óleo de anis, de acordo com a Pharmeduropa [7]. As manchas adicionais são permitidas na descrição verbal.

Topo da placa		Topo da placa	
			Uma zona violeta (hidrocarbonetos de monoterpeno)
Anetol: uma mancha se apagando	Uma mancha se apagando (Anetol)	Anetol: uma mancha rosa alaranjada	Uma mancha rosa alaranjada (Anetol)
-----	-----	-----	-----
Anisaldeído: uma mancha se apagando	Uma mancha se apagando (anisaldeído)		
-----	-----	-----	-----
		Linalol: uma mancha azul	Uma mancha azul (linalol)
Solução de referência	Solução de teste	Solução de referência	Solução de teste

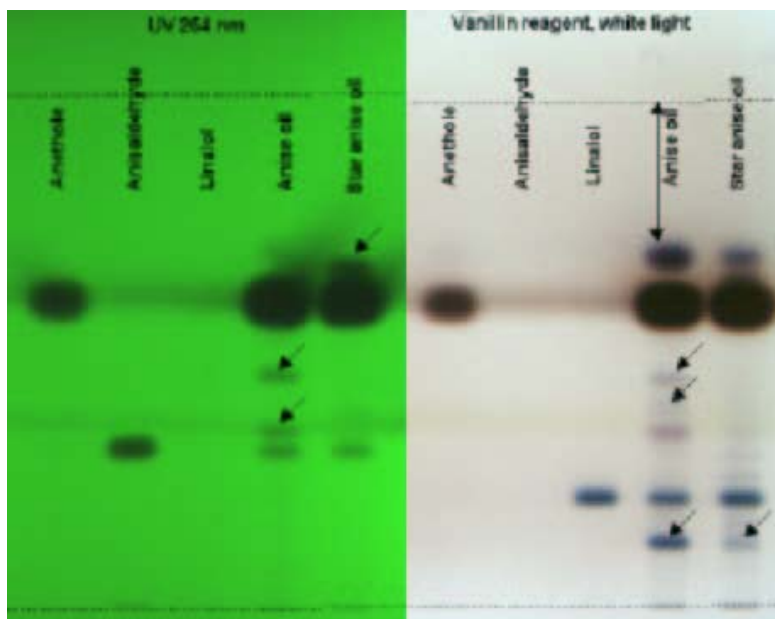


Figura 9 – Identificação do óleo de anis e óleo de anis estrela por TLC, de acordo com a Ph. Eur. [6]. Fase móvel: etil acetato, tolueno (7:93 V/V)
 Esquerda: UV a 254 nm, logo após a derivatização com reagente vanilina, luz branca. Todas as zonas marcadas com setas não são mencionadas na monografia da Ph. Eur. citada. A mancha descrita como “próximo ao front do solvente” aparece a Rf 0,75.

Fica aparente que no exemplo dado, nem a descrição verbal nem a tabular se encaixam no resultado para qualquer um dos 2 óleos vistos na placa/imagens da TLC. Todas as zonas marcadas com setas não são mencionadas na monografia [6], nem a presença das “outras” zonas permitidas. Portanto, a questão mais importante é se alguma das amostras passaria no teste de identificação farmacopéica para óleo de anis ou óleo de anis estrela. As imagens mostram que ambos os óleos são distintamente diferentes e podem ser facilmente discriminados.

(Nota: Atualmente, as monografias para óleo de anis e óleos de anis estrela estão em revisão).

Quanto a todas as outras etapas da TLC também para a documentação, usando técnicas de geração de imagens eletrônicas, é da maior importância que todos os parâmetros sejam precisamente especificados e validados para assegurar

resultados reprodutíveis. No futuro próximo, poder-se-ia prever que as imagens eletrônicas dos cromatogramas da TLC se tornem a base de um Atlas, que seria um suplemento útil para as monografias sobre plantas medicinais. Seria uma vantagem particular desse atlas, se não fosse fornecida apenas uma fotomicrografia de cada planta, mas também as imagens geradas através de múltiplas detecções. Além do mais, a variabilidade natural de cada planta poderia ser ilustrada analisando-se vários lotes representativos da mesma placa. Por último, as fotomicrografias de adulterantes comumente encontrados poderiam ser incluídas também.

3.6 Padronização e Harmonização Internacional

Nas seções precedentes, vários parâmetros importantes foram discutidos juntamente com algumas sugestões de mudanças na descrição geral do método [8] e nas monografias individuais das farmacopéias. Entretanto, deve também ser observado que o fornecimento de uma estrutura adequada não é suficiente para utilizar todo o potencial da TLC moderna. Uma nova abordagem metodológica padronizada deve também ser tomada. Essa abordagem, similar a um POP (Procedimento Operacional Padrão), poderia ser incluída no Guia Técnico para a Elaboração de Monografias [2]. O exemplo mostrado na Figura 10 deve ilustrar o problema. Um método para a identificação da *Angelica sinensis* e da *Levisticum officinale* por HPTLC foi desenvolvido pelo laboratório A, colocado por escrito e transferido para o laboratório B para verificação. Os resultados obtidos são praticamente similares, embora de jeito nenhum iguais, apesar de ambos os laboratórios pensarem ter seguido o método em detalhes. Um exame mais detalhado revela que existem algumas diferenças nas práticas comuns dos 2 laboratórios, que foram assumidas como sendo “o modo correto de fazer”.

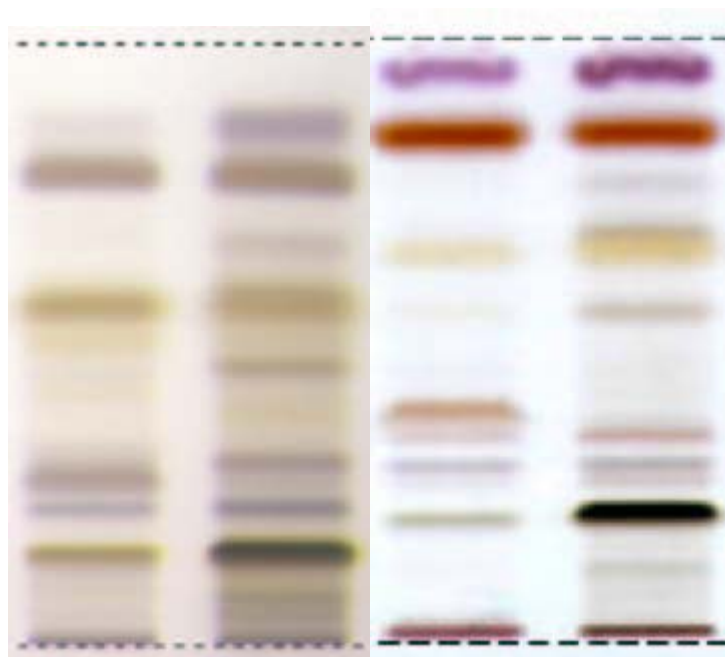


Figura 10 - HPTLC da *Angelica sinensis* (track esquerdo) e *Levisticum officinale* (track direito). Fase móvel: ácido fórmico, etil acetato, tolueno (1:10:90 V/V/V)

Detalhes experimentais	Laboratório A (imagem esquerda)	Laboratório B (imagem direita)
Pré-lavagem	Não	MeOH-CHCl ₃ (secagem em estufa a 105°, 30 min)
Saturação da cuba	20 min (papel filtro)	15 min (sem papel)
Derivatização	Imersão	Pulverização
Documentação	Vídeo, reflexão + transmissão	Scanner de mesa
Atividade da placa	Equilíbrio com o laboratório, 40% UR.	Durante a noite (P2O ₅), UR desconhecida.

A Figura 11 mostra os resultados da identificação da *Rudbeckia* (*Echinacea* spp) por HPTLC. O método segue estritamente uma metodologia padronizada [9]. Ele foi inteiramente validado de acordo com as orientações do Programa de Métodos Pares Verificados do AOAC [10]. Os resultados obtidos nos dois laboratórios independentes, em momentos diferentes, são quase idênticos [11]. Este método foi submetido aos comentários da Pharmeuropa (Raiz de

Rudbeckia de folhas estreitas [12], raiz de *Rudbeckia* pálida [13], raiz de *Rudbeckia* púrpura [14]).

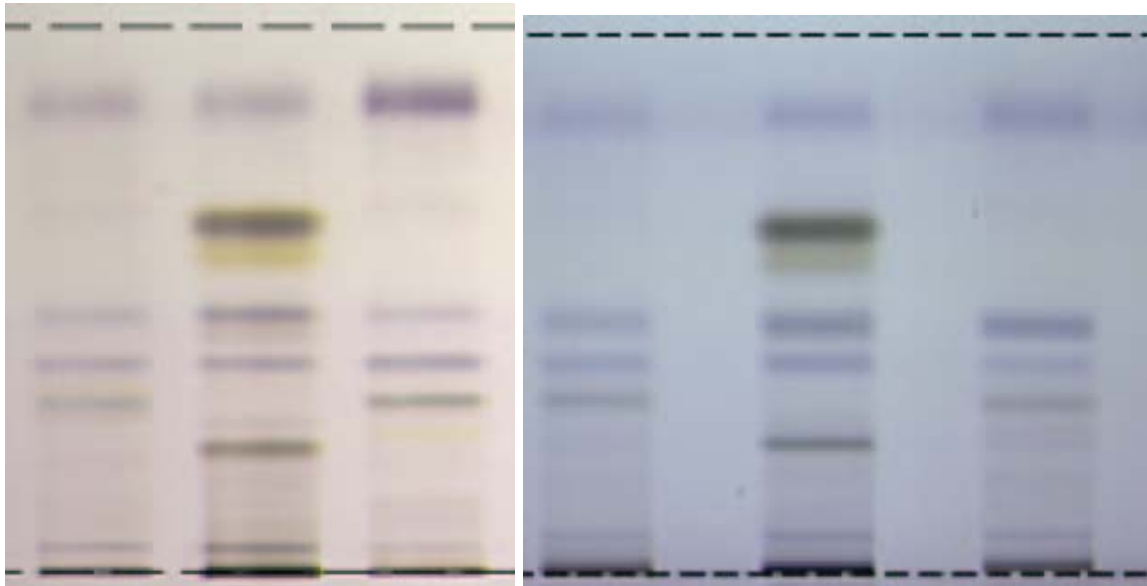


Figura 11 – Identificação da *Echinacea* spp por HPTLC à base de alquilamidas. Método de pares verificados do AOAC. Fase móvel: ácido fórmico, ciclohexano, etil acetato, tolueno (0.9:3:6:24 V/V/V/V), derivatização com reagente anisaldeído. Esquerda: laboratório A (placa desenvolvida em julho de 2002), direita: laboratório B (setembro de 2001). *E. purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia* (tracks da esquerda para a direita)

CONCLUSÕES

Com base nas considerações teóricas e práticas, parece necessário revisar criticamente a descrição geral do método da Farmacopéia Européia quanto à Cromatografia em Camada Delgada. O desenvolvimento de monografias novas, assim como a revisão das monografias existentes sobre plantas medicinais deve incluir a identificação por TLC, que é baseada em uma metodologia padronizada moderna. Os seguintes elementos-chave devem ser considerados:

1. Os métodos da TLC devem ser geralmente baseados nas placas de HPTLC.

2. Para obter melhores resultados qualitativos e quantitativos, as amostras devem ser aplicadas na forma de bandas estreitas, preferivelmente usando a técnica de pulverização (spray).
3. Deve ser recomendado para, geralmente desenvolver, as placas de HPTLC em uma cuba saturada em uma distância de 6 cm.
4. Quanto aos métodos que contam com as reações em cores para a visualização do resultado cromatográfico, a etapa da derivatização deve ser explicitamente descrita.
5. Além de uma descrição do resultado de um método, deve ser fornecida uma imagem colorida, preferivelmente na forma de um atlas. Múltiplas imagens (tal como sob UV a 254 nm, UV a 366 nm e luz branca) podem aumentar significativamente a certeza do resultado analítico. Fornecer material de referência para os produtos a serem testados pode também ser considerado. A padronização metodológica na TLC é um requisito fundamental para a comparabilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

- 1 Reich E, Blatter A. *HPTLC for the Analysis of Herbal drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products*. In: Sherma J, Fried B, editors. *Handbook of Thin-Layer Chromatography* 3rd ed, Chapter 18. New York: Dekker; 2003 (in print).
- 2 European Pharmacopoeia, *Technical Guide for the Elaboration of Monographs*, 3rd ed., Strasbourg: Council of Europe; 1999.
- 3 Poole CF, Poole SK. *Chromatography today*. Amsterdam: Elsevier Science; 1991.
- 4 Geiss F. *Fundamentals of Thin Layer Chromatography*. Heidelberg: Hüthig; 1987.
- 5 Frey HP, Zieloff K. *Qualitative und quantitative Dünnschicht-Chromatographie*. Weinheim, New York, Cambridge: VCH; 1993: 78-88.

- 6 *Anise oil*, monograph 804. In: Ph. Eur. 3th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2000
- 7 *Anise oil*, monograph 0804. Pharmeuropa 2001 Jul; 13.3:555.
- 8 *Thin-Layer Chromatography*, general method 2.02.27.00. In: Ph. Eur. 4th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2002
- 9 Reich E, Blatter A. A Standardized Approach to Modern High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). In: Vovk I, Medja A, editors. Proceedings of the International Symposium "Planar Chromatography Today": Novo Mesto; 2002 Oct 4-6
- 10 AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures. AOAC International. Available at <http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/omamannual.htm> [accessed April 2003]
- 11 Reich E, Blatter A, Jorns R et al. An AOAC Peer-Verified Method for Identification of *Echinacea* Species by HPTLC. *J Planar Chromatography* 2002, 15:244-51.
- 12 *Narrow-leaved coneflower root*, monograph 1821. Pharmeuropa 2002 Jan; **14.1** :135-6.
- 13 *Pale coneflower root*, monograph 1822. Pharmeuropa 2002 Jan; **14.1** :137-8.
- 14 *Purple coneflower root*, monograph 1824. Pharmeuropa 2002 Jan; **14.1** :140-1.