

Análise cromatográfica em camada delgada comparativa de extratos de *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe

Comparative analysis of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe extracts by means of thin-layer chromatography

RIALA6/988

Mônica Arcon BATISTIC^{1*}, Maria Aparecida NICOLETTI², Mariangela Tirico AURICCHIO¹

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Bromatologia e Química, Serviço de Medicamentos, Av. Dr. Arnaldo, 355, 5º andar CEP: 01246-902, São Paulo- SP - e-mail: mbatistic@ial.sp.gov.br

¹ Serviço de Medicamentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

² Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Recebido: 14/12/2002 – Aceito para publicação: 14/10/2004

RESUMO

As várias espécies do gênero *Curcuma* têm sido estudadas desde a década de 60, pois há muito são amplamente cultivadas e utilizadas na medicina popular de todo sudeste asiático. Hoje seu uso é bem difundido entre nós e, apesar da utilização de várias técnicas para a caracterização dos extratos, o controle de qualidade desses fitoterápicos constitui um desafio para o laboratório de Saúde Pública. Este estudo propõe um método rápido e pouco dispendioso, empregando cromatografia em camada delgada e que mostrou-se eficaz na avaliação de extratos de *Curcuma zedoaria*.

Palavras-Chave. *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe; cromatografia em camada delgada; perfil cromatográfico.

ABSTRACT

Several *Curcuma* species have been studied since the sixties due to its widespread cultivation in the whole Southeast area, and for its use as popular medicine. Nowadays, *Curcuma* has also been largely employed in Brazil. Although diverse analytical techniques have been used for *Curcuma* extracts characterization, its quality control still defies the public health laboratory. The present work proposes a rapid and low cost method using thin-layer chromatography in order to differentiate *Curcuma zedoaria* from diverse origin.

Key Words. *Curcuma zedoaria* (Christ.) Roscoe; thin-layer chromatography; chromatographic profile.

INTRODUÇÃO

As curcumas são plantas herbáceas perenes do gênero Indo-Malaio *Curcuma*, cultivadas há muito na Índia, China, Indonésia, Paquistão e outros países²⁴, sendo usadas em afecções hepáticas em todo Sudeste Asiático. A *Curcuma zedoaria*, em particular, consta da publicação “The Indian Materia Medica”²⁵ desde 1927, tendo sido assinalada no Brasil por Coimbra em “Notas de Fitoterapia”², já em 1958 e posteriormente por Miyake²⁴, em 1986. Desde a década de 60, no Japão, várias espécies do gênero *Curcuma* vêm sendo estudadas quanto a sua composição³⁰. De 1966 a 1972, Hikino et al.^{6,7,8,9,10,11,12,13,14,15}, em uma série de estudos, isolaram e estabeleceram a estrutura dos sesquiterpenos como o curcumol, a curdiona, o curcumerol, a zederona, entre outros, aos quais tem sido atribuídas atividades antiinflamatória³¹,

hepatoprotetora^{21,22} e antimutagênica¹⁹. A demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, isoladas por Syu et al.²⁹, mostraram atividade citotóxica contra células de neoplasia maligna ovarianas. As frações polissacarídicas têm sido isoladas e despertado interesse quanto às possíveis ações farmacológicas, dentre as quais as atividades antitumoral, genotóxica e anticlastrogênica^{17,18}. Gupta et al.⁴ caracterizaram o *p*-metoxicinamato de etila como o principal agente da atividade anti-fúngica da *Curcuma zedoaria*.

O interesse no potencial farmacológico desta planta tem justificado estudos de micropropagação para aumento de sua produção como forma mais econômica, comparativamente à produção vegetativa²³. Cao et al.¹ estabeleceram os parâmetros para a análise molecular para caracterizar taxonomicamente as espécies de *Curcuma* empregadas na China e no Japão, com base nas seqüências de genes.

Ao longo dos anos, várias técnicas vêm sendo utilizadas para a caracterização dos principais constituintes da *C. zedoaria*. Kato e Fisher¹⁶ caracterizaram as raízes e rizomas desta espécie, utilizando a cromatografia em camada delgada. Nos últimos dez anos, podem ser citadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrometria de massas acoplada à cromatografia em fase gasosa (CG-EM), associadas à extração por fluido super crítico²⁰. Hiermann e Radl⁵ descreveram a utilização da eletroforese capilar; mais recentemente, o Optimum Performance Laminar Chromatography (OPLC) é apontado como método de separação mais eficiente para vários tipos de compostos^{3,26,27,28}.

A despeito da reconhecida utilidade das preparações extrativas e de fitoterápicos feitos com *C. zedoaria*, controlar a qualidade de sua produção é um desafio para Laboratórios de Saúde Pública devido aos custos do instrumental necessário para essa atividade. Com o objetivo de superar essa limitação, neste estudo propomos um método rápido e de baixo custo, com base em cromatografia em camada delgada, e que permite diferenciar os perfis cromatográficos de extratos de *Curcuma* de diferentes origens.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram estudadas quatro amostras de *Curcuma zedoaria* e uma amostra de *Curcuma longa*, das seguintes procedências: amostra 1- Ibiúna, SP; amostra 2- Ribeirão Preto, SP; amostra 3- Campo Grande, MS; amostra 4- Índia e amostra 5 (*C. longa*)- São Paulo, SP. A amostra de *Curcuma zedoaria* proveniente de Ibiúna, SP, foi identificada pela Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica, onde a exsiccata foi depositada sob número de registro 338498, e utilizada como a droga padrão na análise cromatográfica.

Métodos

Preparo das amostras

Para cada amostra, exceto para a amostra de Campo Grande, foram preparados dois tipos de extratos com mistura hidroalcoólica a 70%: por percolação simples e percolação fracionada. Foram preparados extratos metanólicos a partir da droga moída destas amostras, na concentração de 1 g por 5 mL de metanol, segundo Wagner³².

Sistema cromatográfico

Os cromatogramas foram desenvolvidos em duas diferentes fases móveis:

Fase móvel 1 - tolueno: acetato de etila (93:7)

Fase móvel 2 - clorofórmio

por cromatografia ascendente, utilizando-se placas de Sílica Gel 60 F 254 Merck, e o revelador anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento a 110°C por 5 minutos³². Foram aplicados 5 µL de cada amostra dos extratos simples, fracionados e metanólicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas figuras 1 e 2 estão representados os cromatogramas obtidos para os extratos simples, fracionados e metanólicos das cinco amostras, nas fases móveis 1 e 2. Observou-se que tanto para a fase móvel 1 como para a fase móvel 2 houve boa separação dos componentes dos extratos aplicados, com manchas diferenciadas e distribuídas por toda a placa, em diferentes Rf(s), variando de 0,1 a 0,93 (fase 1) e de 0,1 a 0,5 (fase 2). Pode-se constatar diferentes tons de coloração para as manchas obtidas em cada um dos extratos na fase móvel 1 (figura 1), favorecendo sua visualização e caracterização, ao contrário do que ocorreu com aquelas observadas na fase móvel 2 (figura 2).

Quanto aos perfis cromatográficos observados para cada amostra, pode-se notar que as manchas dos extratos fluidos obtidos por percolação simples (EFPS) foram menos intensas que aquelas obtidas por percolação fracionada (EFPF), sugerindo que o sistema utilizado responde às variações de concentrações entre os extratos. Esta observação pode ser relevante quando o processo de preparação da amostra a analisar não é conhecido e podem resultar em diferenças significativas no perfil cromatográfico. Os extratos metanólicos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos obtidos para os dois tipos de percolação.

Apesar de métodos cromatográficos mais sofisticados disponíveis atualmente, o desenvolvimento da cromatografia em camada delgada (CCD), para amostras de extratos fluidos de *Curcuma zedoaria* de quatro diferentes procedências, demonstra que esta técnica é de grande utilidade na análise de drogas vegetais e suas preparações, mesmo nos laboratórios com limitações de recursos. Pelos resultados obtidos em ambos sistemas cromatográficos (figuras 1 e 2), pode-se afirmar que os extratos fluidos das amostras 2 e 3 são semelhantes ao obtido para a amostra 1, considerada como a droga padrão neste estudo. Optou-se pelo uso de uma droga com identidade botânica certificada para a caracterização cromatográfica tanto da droga como de suas preparações extrativas, e não simplesmente o uso de marcadores cromatográficos, já que a comparação dos perfis é o escopo do trabalho e por ser esta a situação mais comumente encontrada nos laboratórios oficiais. As diferenças observadas para a amostra 4, proveniente da Índia, são nítidas e perfeitamente detectadas por esta técnica, confirmando o fato de que condições climáticas, diferentes cultivos, variedades botânicas, tempo de secagem e outros fatores podem modificar os constituintes das drogas vegetais, alterando seu perfil cromatográfico. Porém, como a técnica de CCD pode fornecer a caracterização de uma determinada espécie, grandes alterações de perfis indicariam, com certeza, alterações, adulterações ou mesmo substituições desta droga por outra espécie qualquer. Isto pode ser constatado com a comparação dos perfis das amostras 1,2,3 e 4 com a amostra 5, de *Curcuma longa*, que apesar de pertencer ao mesmo gênero da *C. zedoaria*, revelou diferente composição, claramente visualizada nos cromatogramas.

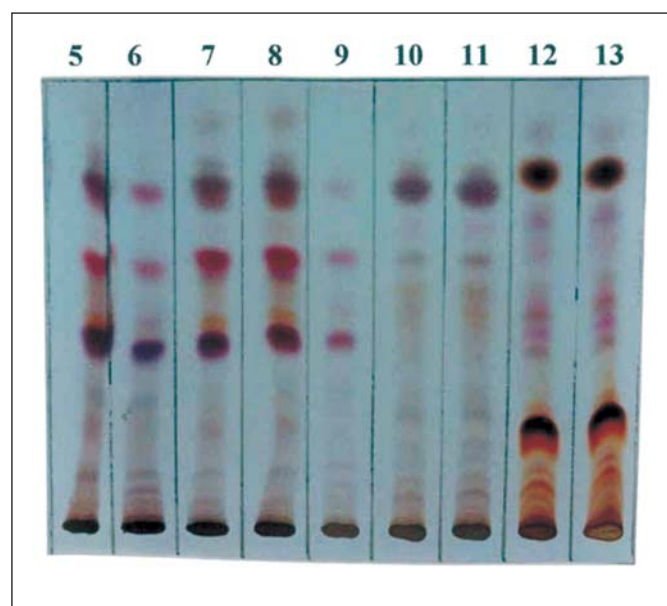


Figura 1. Placa cromatográfica desenvolvida na fase móvel 1 (tolueno: acetato de etila- 93:7)

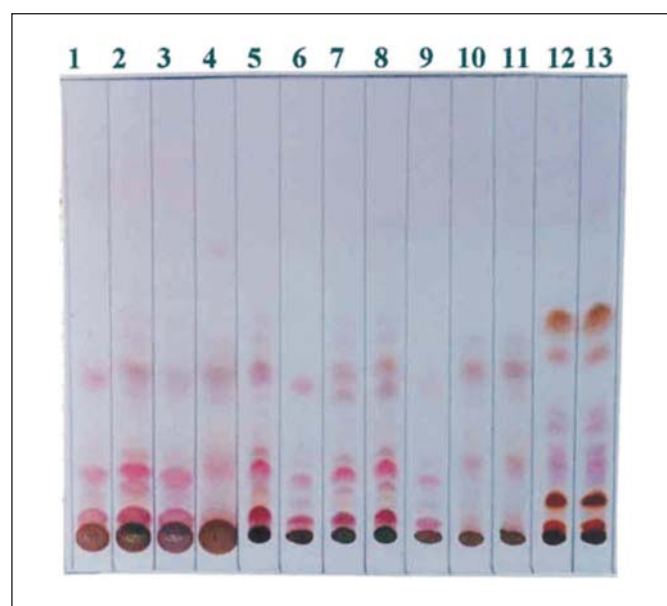


Figura 2. Placa cromatográfica desenvolvida na fase móvel 2 (clorofórmio)

Legendas das Figuras 1 e 2

- 1 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 1- Ibiúna, SP)
- 2 - extrato metanólico de *G. zedoaria* (amostra 2- Ribeirão Preto, SP)
- 3 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 3- Campo Grande, MS)
- 4 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 4- Índia)
- 5 e 6 - extratos fracionado e simples de *C. zedoaria* (amostra 1)
- 7 e 8 - extratos simples e fracionado de *C. zedoaria* (amostra 2)
- 9 - extrato simples de *C. zedoaria* (amostra 3)
- 10 e 11 - extratos simples e fracionado de *C. zedoaria* (amostra 4)
- 12 e 13 - extratos simples e fracionado de *C. Tonga* (amostra 5)

Como neste estudo pretendeu-se caracterizar outros componentes da *C. zedoaria*, que não os óleos essenciais³³ por cromatografia em camada delgada, procedeu-se à percolação simples e fracionada das drogas em pó, para a obtenção de extratos hidroalcoólicos, paralelamente à uma extração com metanol a quente (60°C, por 5 minutos). A utilização do revelador anisaldeído sulfúrico mostrou eficiência na revelação das manchas das amostra de *C. zedoaria*, produzindo manchas de coloração bem variadas, com excelente diferenciação das mesmas. Sendo que os extratos metanólicos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos obtidos para os dois tipos de percolação, o uso deste método por um laboratório de controle de qualidade sem instrumentação cara e sofisticada como, por exemplo, o de uma farmácia de manipulação, permitirá uma rápida avaliação da matéria-prima em pó desta droga, bem como do seu fitoterápico.

REFERÊNCIAS

1. Cao, H et al. Molecular analysis of medicinally-used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and trnK gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, 1: 1389-94, 2001.
2. Coimbra, R. **Notas de Fitoterapia**. 2ª ed., Edição do Laboratório Clínico Silva Araújo S.A., Rio de Janeiro, 1958.
3. Galand, N. et al. OPLC and AMD, recent techniques of planar chromatography: their interest for separation and characterization of extractive and synthetic compounds. *Fitoterapia*, 73: 121-34, 2002.
4. Gupta, S. K. et al. Isolation of Ethyl *p*-Methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia*, 39(4):218-22, 1976.
5. Hiermann, A ; Radl, B. Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatog. A*, 803: 311-4, 1998.
6. Hikino, H. et al. Structure of Curcumol. *Chem. Pharm. Bull.*, 14 (11): 1241-49, 1966.
7. Hikino, H. et al. Structure of Curdione. *Chem. Pharm. Bull.*, 15 (9): 1390-94, 1967.
8. Hikino, H. et al. Structure of Curcumenol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16: 39- 42, 1968.
9. Hikino, H. et al. Structure of Dehydrocurdione, a Sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *Chem. Pharm. Bull.*, 20 (5): 987-9, 1972.
10. Hikino, H. et al. Structure of Zederone. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (6): 1081-7, 1968.
11. Hikino, H. et al. Structure of Procuremenol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (8): 1605-7, 1968.
12. Hikino, H. et al. Structure of Curcumol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (5): 827-31, 1968.
13. Hikino, H. et al. Furanodiene, a precursor of furan-containing sesquiterpenoids. *Tetrahedron*, 8: 931-3, 1968.
14. Hikino, H. et al. Structure of Curzerenone, Epicurzerenone and isofuranogermacrene. *Tetrahedron*, 24: 2855-8, 1968.
15. Hikino, H. et al. Sesquiterpenoids. Part XXXVII. Absolute Configuration and Conformation of Zederone, a Sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *J. Chem. Soc. (C)*: 688-91, 1971.
16. Kato, E.T.M.; Fisher, D.C.H. Estudo morfo-histológico e cromatográfico em camada delgada comparativo de raízes e de rizomas de *Curcuma zedoaria* (Bergius) Roscoe- droga, óleo essencial e extrato fluido. *LECTA- USF*, 14 (2): 9-26, jul./dez.1996.
17. Kim, K.I. et al. Antitumor, genotoxicity and anticlastrogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. *Mol. Cells*. 31(4): 392-8, 2000.

18. Kim, K.I. et al. Effects of polyssaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 65(11): 2369-77, 2001.
19. Lee, H.; Lin, J.Y. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. **Mutat. Res.**, 204(2):229-234, 1998.
20. Ma, H.Z. et al. Application of off-line supercritical-fluid extraction-gas chromatography for the investigation of chemical-constituents in *Curcuma zedoaria*. **Phytochem. Analysis**, 6(6): 292-6, 1995.
21. Matsuda, H. et al. Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from Zedoariae Rhizoma on D- galactosamine/ lipopolysaccharide-induced liver injury. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8(4):339-44, 1998.
22. Matsuda, H. et al. Hepatoprotective constituents from Zedoariae rhizoma: absolute stereostructures of three new carabrane-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B and C. **Bioorg. Med. Chem.**, 9: 909-16, 2001.
23. Mello, M.O. et al. Quantificação da Micropropagação de *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Sci. Agric.**, 57(4): 703-7, 2000.
24. Miyake, E. T. Zedoária- *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 1(2): 118-262, 1986.
25. Nadkarni, K.M. **The Indian Materia Medica** , Bombay, 1927.
26. Nyireddy, S. The bridge between TLC and HPLC: overpressured layer chromatography (OPLC). **Trends Analyt. Chem.**, 20 (2): 91-101, 2001.
27. Poole, C.F., Dias, N. C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. **J. Chromatog. A** , 892: 123-42, 2000.
28. Poole, C.F. Planar chromatography at the turn of the century. **J. Chromatog. A** , 856:399-427, 1999.
29. Syu, W. J. et al. Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. **J. Nat. Prod.**, 61(12): 1531-4, 1998.
30. Takano, I. et al. Guaiane sesquiterpene lactones from *Curcuma aeruginosa*. **Phytochemistry**, 40(4): 1197- 2000, 1995.
31. Yoshioka, T. et al.. Antiinflammatory potency of dehydrocurdione, a zedoary-derived sesquiterpene. **Inflamm. Res.**, 47(12):476-81, 1998.
32. Wagner, H.; Bladt, S. **Plant drug analysis**. Heidelberg, Springer-Verlag, 1996, 384 p.