

## Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal

### Use of Countercurrent Chromatography for the preparation of standard compounds from plants

\*Leitão, G. G.

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco H, CCS, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\*Correspondência: E-mail: ggleitao@nppn.ufrj.br/www.nppn.ufrj.br

#### Resumo

*A técnica da cromatografia contracorrente é aqui apresentada como uma ferramenta eficiente, rápida e econômica de obtenção de padrões de origem vegetal com alto grau de pureza. São discutidos alguns aspectos da escolha dos sistemas de solventes adequados além de exemplos de isolamento e purificação de substâncias naturais de importância farmacêutica tais como flavonóides de Ginkgo biloba, saponinas de Centella asiatica e Ginseng, antraquinonas, etc.*

#### Abstract

*Countercurrent chromatography technique is presented here as a tool for the fast, efficient and economic preparation of highly pure standard compounds from plant origin. Some aspects concerning solvent systems choice as well as examples of the isolation and purification of pure natural compounds of pharmaceutical importance, such as flavonoids from Ginkgo biloba, saponins from Centella asiatica and Ginseng, anthraquinones, etc., are discussed.*

#### Unitermos:

Cromatografia contracorrente, padrões, produtos naturais

#### Key words:

Countercurrent Chromatography, standards, natural products

#### Introdução

Nos últimos 50 anos, os métodos cromatográficos tornaram possível a separação de misturas complexas, tanto em escala preparativa quanto analítica. A cromatografia em coluna, baseada em processos adsorptivos, usa suportes sólidos como fase estacionária, enquanto aquela baseada na partição em duas fases líquidas, a fase líquida estacionária está adsorvida em um suporte. Em ambos os casos, a interação soluto-sólido pode causar adsorção irreversível e/ou modificações químicas nos componentes das misturas submetidas a separação.

A cromatografia contracorrente (CCC) é essencialmente uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase líquida estacionária é retida no aparelho sem o uso de suportes sólidos (BERTHOD, 1991; CONWAY, 1990). Na maioria dos tipos de CCC, uma das fases de um sistema de solventes bifásico permanece estacionária, enquanto a outra é passada através dela. O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre as duas fases imiscíveis e a proporção de



soluto que passa para cada uma das fases é uma função do seu coeficiente de partição (MARSTON; HOSTETTMANN, 1984). Os primeiros aparelhos (contracorrente de gotículas e de rotação locular) apareceram na década de 70 e nesses casos, operavam de forma que a fase líquida estacionária era retida apenas pela ação de um campo gravitacional. Com a introdução de aparelhos operando com um campo de força centrífuga (tanto de gotículas quanto daqueles que usam colunas em espiral - coil), onde são produzidos campos de aceleração em torno de 40 g (g = constante gravitacional) ou mais, foi possível a obtenção de fluxos de solventes bem maiores, permitindo tempos de análise variando entre duas a seis horas. A cromatografia contracorrente é útil principalmente na separação preparativa, na escala de miligramas a gramas de material. Hoje em dia, aparelhos maiores, com bobinas de 15 a 25 litros têm sido desenvolvidos, permitindo separações em escala industriais. A técnica é particularmente útil para substâncias polares e lábeis; casos estes em que a cromatografia com uso de suportes sólidos é totalmente desaconselhada. Entretanto, essa técnica não é restrita a esses derivados, já que sistemas aquosos e não aquosos podem ser empregados (MARSTON; HOSTETTMANN, 1984). As principais vantagens da técnica são (CONWAY, 1990): (a) a versatilidade em relação ao sistema de solventes (à fase móvel pode ser a superior ou a inferior), em relação à quantidade de amostra e ao tipo de amostra a ser separada (sem a necessidade prévia de pré-purificação como na CLAE); (b) a rapidez e eficiência do método; (c) boa resolução e reprodutibilidade; (d) economia: as colunas são indestrutíveis (feitas de teflon e mais modernamente em aço inox); os sistemas bifásicos aquosos utilizam água destilada como um dos componentes das fases (não requer a pureza dos solventes utilizados na CLAE); (e) recuperação total da amostra já que não há perdas por adsorção; (f) recuperação da atividade biológica em fracionamentos guiados por testes biológicos. Dessa forma, a CCC representa uma ferramenta excelente na obtenção de padrões químicos de origem vegetal, pela simplicidade de operação, eficiência, e economia de tempo e de solvente.

### A Escolha do Sistema de Solventes Adequado

A escolha do sistema de solventes adequado ao isolamento de substâncias de origem natural é o ponto-chave para o sucesso da técnica. Geralmente são

usados sistemas de solventes formados por no mínimo três solventes, principalmente na técnica de gotículas, onde há várias limitações quanto aos sistemas de solventes (HOSTETTMANN; HOSTETTMANN; MARSTON, 1984). Sistemas com quatro e às vezes cinco solventes também são comuns. Várias estratégias têm sido apresentadas na literatura e cada pesquisador deve escolher aquela que mais lhe convém. Uma dessas estratégias é baseada na escolha inicial do "melhor solvente", ou seja, aquele que solubilizar bem a amostra, ao qual serão adicionados então dois ou mais solventes (imiscíveis), com polaridades bem distintas, e que formarão então o sistema bifásico (FOUCAULT, 1995; RENAULT et al., 2002). Outra maneira de testar sistemas é a combinação de solventes em "séries inteligentes" onde a proporção dos solventes varia gradualmente em cada combinação. As misturas resultantes apresentam um gradiente de polaridade crescente de modo a formar uma escala (FOUCAULT, 1995; RENAULT et al., 2002). Estratégias semelhantes têm sido desenvolvidas com a ajuda de "robôs", tornando o processo automatizado (GARRARD, 2005).

Uma alternativa aos métodos citados acima, é a utilização de sistemas de solventes citados na literatura para uma determinada classe de produtos naturais. Nesse sentido, os trabalhos clássicos do grupo do Prof. Hostettmann (HOSTETTMANN; HOSTETTMANN; MARSTON, 1984; MARSTON, 1990; MARSTON; HOSTETTMANN, 1984; HOSTETTMANN; MARSTON, 2001) são de grande valor, pois apresentam várias tabelas e exemplos ilustrativos do isolamento de substâncias de várias classes de produtos naturais.

### Alguns Exemplos Selecionados

Os produtos naturais têm desempenhado um papel cada vez mais importante na indústria farmacêutica, de cosméticos, flavorizantes, e suplementos alimentares. Devido à preocupação crescente com a saúde e o meio-ambiente, vários produtos à base de produtos naturais (extratos ou substâncias puras) têm sido desenvolvidos para uso medicinal ou como alimentos funcionais, aditivos em cosméticos ou outros produtos de uso pessoal diário ou para o cuidado da casa (ZHANG, 2003). Na maioria das vezes, as substâncias ativas estão presentes nos extratos em pequenas quantidades, sob a forma de misturas complexas, e a cromatografia contracorrente apresenta então uma série de vantagens no isolamento e obtenção dessas substâncias. Os





padrões químicos de referência também possuem um papel fundamental no controle de qualidade. No caso de produtos à base de extratos vegetais ou de substâncias de origem vegetal, o controle de qualidade necessita de padrões que nem sempre estão disponíveis comercialmente. Pelo contrário, existe uma carência de produtos naturais bioativos com alto grau de pureza, e os que existem têm um custo extremamente elevado (ZHANG, 2003).

### Isolamento de Padrões para o Controle de Qualidade de Plantas Medicinais Chinesas e Agroprodutos

O grupo do Prof. T. Zhang, do Beijing Institute of New Technology Application, na China, desenvolveu um programa de isolamento de produtos naturais de plantas usadas na medicina popular chinesa e de agroprodutos usando a cromatografia contracorrente (ZHANG, 2003). Nesse trabalho, os autores apresentam os dados de isolamento de 12 substâncias padrão, de várias classes, obtidas de seis plantas diferentes. Um dos exemplos é o isolamento dos flavonóides quercetina, kaempferol e isorhamnetina, de folhas de Ginkgo biloba. O extrato de Ginkgo (200 mg) foi purificado através de um sistema multidimensional, onde dois equipamentos do tipo HSCCC (High-Speed Countercurrent Chromatography) foram conectados em série. Com o sistema de solventes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  4/3/2 (v/v/v), fase inferior (orgânica) como fase móvel, 2 mL/min, a fração contendo os flavonóides foi pré-purificada, passando diretamente ao segundo equipamento, onde foram então separados, com o mesmo sistema de solventes e condições de análise (ZHANG, 2002). Nosso grupo também separou o flavonóide quercetina de uma mistura de flavonóides glicosilados de folhas do Limão Bravo, *Siparuna guianensis*, utilizando um sistema de gradiente, composto de Hexano/AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  0,6/4/x/1, onde x variou de 0,01 a 0,7, utilizando aparelho do tipo HSCCC, fase aquosa como fase móvel, 2 mL/min. Com essa técnica foi possível isolar a quercetina em forma pura, além de mistura de flavonóides diglicosilados, que se separaram dos flavonóides monoglicosilados (LEITÃO et al., 2005).

O isolamento do resveratrol e do piceídiol, estilbenos de interesse farmacêutico por suas propriedades em doenças cardiovasculares, do sistema nervoso, nas inflamações e abscessos, a partir de extratos

de *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. (Huzheng em Chinês), foi obtido em duas etapas (ZHANG, 2002). O resveratrol (72,5 mg) foi obtido a partir de um extrato em acetato de etila (252 mg), purificado com o sistema AcOEt/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  10/1/10, fase aquosa como fase móvel, 2 mL/min. O piceídiol (35,5 mg) foi isolado a partir de um extrato aquoso (310 mg) da mesma planta, só que em duas etapas: na primeira, o sistema de solventes foi AcOEt/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  50/1/50 v/v/v, onde uma fração contendo os flavonóides foi inicialmente obtida, sendo depois re-cromatografada; desta vez mudando-se a proporção de etanol no sistema, que foi AcOEt/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  10/1/10, o mesmo utilizado na separação do resveratrol (ZHANG, 2002).

### Separação de Saponinas Damarânicas de Raízes de *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen ("Sanchi ginseng") (CAO, 2003)

O "*sanchi ginseng*" (ou "*tienchi ginseng*"), uma planta da medicina tradicional chinesa é usada como tônica e hemostática. O "*sanchi ginseng*" é obtido a partir das raízes do *Panax notoginseng* e é prescrito em várias fórmulas chinesas. As saponinas triterpênicas (do tipo damarano) são o principal constituinte e o princípio ativo dos ginsengs, inclusive do "*sanchi ginseng*", taxonomicamente relacionado com o *Panax ginseng* C. A. Meyer. O "*sanchi ginseng*" contém várias saponinas encontradas no *Panax ginseng*, como por exemplo, os ginsenosídeos Rb1, Rd, Re e Rg1, além da saponina característica notoginsenosídeo - R1. Os autores utilizaram, como material de partida, o pó bruto de *P. notoginseng* adquirido em um mercado local de plantas da medicina tradicional chinesa. Um extrato concentrado nas saponinas foi usado para purificação no aparelho de HSCCC. O extrato foi purificado inicialmente com o sistema de solventes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  5/6/1/4 v/v/v/v, fase orgânica como fase móvel, 2 mL/min., fornecendo três frações principais, que, separadamente foram re-purificadas com o sistema AcOEt/1-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  1/1/2 v/v/v, fase orgânica como móvel, 2 mL/min, fornecendo as saponinas puras ginsenosídeo-Rg1 e ginsenosídeo-Rd a partir da primeira fração, notoginsenosídeo-R1 e ginsenosídeo-Re a partir da segunda fração e ginsenosídeo-Rb1 da terceira fração. A cromatografia contracorrente mostrou-se uma técnica poderosa na separação dessas saponinas. Vale lembrar que o preço de catálogo dessas substâncias está na faixa de centena de dólares/5mg (Catálogo SIGMA-Aldrich 2000/2001).





## Separação das Saponinas de *Centella asiatica*

Outro exemplo de isolamento de saponinas triterpênicas é o da separação de asiaticosídeo e madecassosídeo, principais saponinas da *Centella asiatica*, planta medicinal utilizada em processos inflamatórios e cicatrizantes. Diallo e colaboradores (DIALLO et al., 1991) utilizaram como material de partida a água-mãe de cristalização industrial do asiaticosídeo, contendo as duas saponinas em questão. O sistema de solventes utilizado foi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  7/6/3/4 v/v/v/v, em equipamento do tipo HSCCC, equipado com uma coluna de 350 mL. Cerca de 400 mg de amostra foram solubilizadas em 10 mL de uma mistura 1/1 das duas fases imiscíveis. A fase orgânica foi utilizada como fase móvel. Foram recolhidas 80 frações de 12 mL sendo que o asiaticosídeo foi recuperado puro nas frações 28-36 e o madecassosídeo, nas frações 63-70. Além dos excelentes resultados da separação, um fato interessante é que os autores descrevem o monitoramento automatizado das frações através de cromatografia em camada delgada.

## Isolamento de Lactonas de Kava-kava

A Kava-kava (*Piper methysicum*) é usada em várias preparações fitoterápicas e homeopáticas no tratamento da ansiedade, por seus efeitos calmantes e relaxantes e para melhorar o sono (MIKELL et al., 2003). As substâncias farmacologicamente ativas presentes nos extratos de raízes e rizomas são lactonas estruturalmente relacionadas, chamadas de Kavalactonas ou lactonas de Kava e são: a kavaína, diidro-kavaína, yangonina, desmetoxyyangonina, metisticina e diidrometisticina (MIKELL et al., 2003; SCHAFER; WINTERHALTEN, 2005). A padronização de extratos de Kava requer essas substâncias puras como referências. Relatos recentes de hepatotoxicidade relacionada ao consumo de Kava exigem estudos com as substâncias isoladas, o que faz necessário o suprimento dessas substâncias na forma pura, para os estudos farmacológicos (MIKELL et al., 2003). Duas publicações recentes relatam o isolamento de lactonas de Kava por CCC (MIKELL et al., 2003; SCHÄFER; WINTERHALTER, 2005). Mikell e colaboradores (MIKELL et al., 2003) descrevem dois sistemas de solventes, nos quais as lactonas são isoladas com alto grau de pureza. A partir de 1 g de um extrato comercial de Kava, com o sistema de solventes he-

xano/acetona/MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1/3/1), os autores conseguem separar as seis lactonas, com graus de pureza maiores do que 98%, assim obtendo desmetoxyyangonina (53,9 mg), diidro-kavaína (168,2 mg), yangonina (29,5 mg), kavaína (138,0 mg), diidrometisticina (71,0 mg) e metisticina (50,7mg). Os autores comentam ainda que, um segundo sistema de solventes, composto de hexano/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O 3/2/1/2 foi utilizado, fornecendo resultados em tempos menores, fornecendo contudo apenas cinco lactonas puras.

## Separação de Antraquinonas

Antraquinonas são os constituintes ativos de várias plantas medicinais como os Aloés, Cáscara Sagrada, Ruibarbo, Sene, etc. Os extratos dessas plantas são freqüentemente encontrados em medicamentos fitoterápicos e em formulações de laxantes e regularizadores da função intestinal. Um trabalho recente de um grupo da China (YUA et al., 2001) relata o isolamento de antraquinonas de várias drogas usadas na medicina tradicional chinesa. As plantas utilizadas foram o sene, o ruibarbo, o aloé, dentre outras. Os sistemas de solventes usados foram misturas de clorofórmio/metanol/água 4/X/2, onde X variou entre 3 e 4 para cada um dos extratos. Como as antraquinonas possuem uma grande variação em termos de polaridade, o sistema escolhido apresentou resultados excelentes, já que o metanol pode variar, simultaneamente, a seletividade tanto da fase superior quanto da fase inferior, podendo então ser modulada através da variação na concentração desse solvente no sistema (YUA et al., 2001).

## Separação de Fenilpropanóides e Iridóides Glicosilados do Gervão-Roxo (*Stachytarpheta cayennensis*)

Este é outro exemplo da utilização de gradientes em CCC na separação de produtos naturais de extratos vegetais. Os fenilpropanóides martinósídeo, isoverbascosídeo e verbascosídeo e o iridóide ipolamiida, foram isolados em alto grau de pureza, utilizando-se um gradiente não-linear em quatro etapas, composto do sistema de solventes AcOEt/BuOH/H<sub>2</sub>O, 1/x/1, onde x = 0,05; 0,2; 0,5 e 1,0. A fase móvel foi a fase orgânica, superior, onde a concentração do butanol variou de modo a extrair seletivamente os derivados polares da fase aquosa (LEITÃO et al., 2005).





## Conclusões

Os exemplos selecionados da literatura mostram o potencial da técnica da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões fitoquímicos de alta pureza, com rapidez, eficiência e economia de solvente. Várias outras classes de substâncias do metabolismo especial de plantas podem ser isoladas por esta técnica, que apresenta potencial ilimitado.

## Referências

1. ALVI, K.A. Screening Natural Products: Bioassay-Directed Isolation of Active Compounds by Dual-Mode CCC. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.24, n.11&12, p.1765-1773, 2001.
2. BERTHOD, A. Practical Approach to High-Speed Counter-current Chromatography. *Journal of Chromatography*, v.550, p677-693, 1991.
3. CAO, X.; TIAN, Y.; ZHANG, T.; LIU, Q.; JIA, L.; ITO, Y. Separation of Dammarane-Saponins from Notoginseng, Root of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, by HSCCC Coupled with Evaporative Light Scattering Detector. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.26, n.9&10, p.1579-1591, 2003.
4. CONWAY, W.D. Counter-Current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications. New York: VCH Publishers, Inc., 1990.
5. DIALLO, B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M. Direct-Coupling of High-Speed Counter-current Chromatography to Thin-layer Chromatography. Application to the Separation of Asiaticoside and Madecassoside from *Centella asiatica*. *J. Chrom.*, v.556, p446-450, 1991.
6. FOUCAULT, A.P. Solvent Systems in Centrifugal Partition Chromatography In *Centrifugal Partition Chromatography*. New York: ed.Chromatographic Science Series, e.1; Alain P. Foucault, Marcel Dekker Inc., v.68, p.90-92., 1995.
7. GARRAD, I. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.28, n.12-13, p.1923-1935, 2005.
8. HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Countercurrent Chromatography in the Preparative Separation of Plant-Derived Natural Products. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.24, n.11-12, p.1711-1721, 2001.
9. HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. Isolation of Natural Products by Droplet Counter-current Chromatography and Related methods. *Natural Products Report*, v.1, n.5, p.409-512, 1984.
10. LEITÃO, G.G.; EL-ADJI, S.S.; DE MELO, W.L.; LEITÃO, S.G.; BROWN, L. Separation of Free and Glycosylated Flavonoids from *Siparuna guianensis* by Gradient and Isocratic CCC. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.28, n.12-13, p.2041-2051, 2005.
11. LEITÃO, G.G.; DE SOUZA, P.A.; MORAES, A.A.; BROWN, L. Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoids and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.28, n.12-13, p.2053-2060, 2005.
12. MARSTON, A.; SLACANIN, I.; HOSTETTMANN, K. Centrifugal Partition Chromatography in the Separation of natural Products. *Phytochemical Analysis*, v.1, p3-17, 1990.
13. MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Counter-current Chromatography as a Preparative Tool - Applications and Perspectives. *Journal of Chromatography*, v.658, p.315-341, 1994.
14. MIKELL, J.R.; SCHANEBERG, B.T.; KHAN, I.A. Isolation and Purification of Kava lactones by High Performance Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.26, n.18, p.3069-3074, 2003.
15. RENAULT, J.H.; NUZZILLARD, J.M.; INTES, O.; MACIUK, A. Solvent Systems In: BERTHOD, A. (Ed.) *Countercurrent Chromatography, The Support Free Liquid Stationary Phase*. New York: Elsevier, e.1, Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. XXXVIII, 2002.
16. SCHÄFER, K.; WINTERHALTER, P. Application of High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) to the Isolation of Kavalactones. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.28, n.11, p1703-1716, 2005.
17. ZHANG, T. Separation and Purification of natural Products (Medicinal Herbs) by High Speed Countercurrent Chromatography In: BERTHOD, A. (Ed.) *Countercurrent Chromatography, The Support Free Liquid Stationary Phase*. New York: Elsevier, e.1, Comprehensive Analytical Chemistry, v. XXXVIII, 2002.
18. ZHANG, T.; CAO, X.; HAN, X. Preparation of National Certified Reference Materials of Active Compounds from Natural Products by CCC. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.26, n.9-10, 2003.
19. YUA, L. M.; CHEN, X. X.; AI, P.; ZI, M.; WU, P.; LI, Z. Y. Versatile Two-Phase Solvent System for Anthraquinone Prefractionation by High Speed Countercurrent Chromatography. *Journal of Chromatography and Related Technologies*, v.24, n.19, p.2961-1970, 2001.

