

USO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA LA DETERMINACIÓN DE CURCUMINOIDES EN CÚRCUMA Y CURRY PRODUCIDOS Y VENDIDOS EN COSTA RICA

Godofredo Solano Arias*

Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

Recibido 16 de abril 2013; aceptado 30 de junio 2013

Abstract

Turmeric (*Curcuma longa*) rhizome is used as a spice to give colour to food, but its extracts have also shown many interesting biological activities that make *C. longa* valuable for cultivation and consumption. The active compounds in turmeric are known as curcuminoids and their content in the rhizome varies by many factors. It is therefore important to have analytical methods to monitor the quality of the rhizome and the derived products such as curry. Here we show a simple method using ¹H-NMR as a tool for the quantification of curcuminoids in crude extracts. The preliminary results showed that the content of curcuminoids in Costa Rican rhizome crops is similar to that from other regions of the world. A survey of the curcuminoids in turmeric and curry sold in local convenience stores shows that the curcumin content of turmeric is in the range shown in other studies, but that curry is close to the lower values reported in those studies.

Resumen

El rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa*) se usa para dar color a las comidas, sin embargo, sus extractos también han mostrado actividades biológicas interesantes que dan a esta planta un gran valor para su cultivo y consumo. Los compuestos activos de la cúrcuma se conocen como curcuminoides y su composición varía por diversos factores. Por lo tanto, es importante tener métodos de monitoreo de la calidad del rizoma y de productos que la contienen tales como el curry. Se presenta un método usando ¹H-RMN para la cuantificación de curcuminoides en extractos crudos. Los resultados preliminares muestran que el contenido de curcuminoides en el rizoma cultivado en el país es similar al del cultivado en otras regiones del mundo. Además, se evaluó el contenido de los curcuminoides en la cúrcuma y el curry vendidos en negocios locales: la cantidad de curcumina en las muestras de cúrcuma está dentro del rango presentado en otros estudios, no así el curry que presenta valores en el límite bajo.

Key words: *Curcuma longa*, NMR, curcuminoids, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin.

Palabras clave: *Curcuma longa*, RMN, curcuminoides, curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina.

* Autor para correspondencia: godofredo.solano@gmail.com

I. INTRODUCCIÓN

La cúrcuma (Turmeric, *Cúrcuma longa* Linn) es una planta de origen asiático que pertenece a la familia Zingiberaceae. Por miles de años ella ha sido usada como una especia que brinda color a los alimentos como el curry, pero además ha sido ampliamente utilizada en rituales religiosos y en la medicina tradicional china, japonesa e indú, para el tratamiento de diversas dolencias respiratorias, estomacales, dolores no específicos y problemas de la piel como por ejemplo tos, fiebre, ictericia, problemas del hígado y riñones, heridas, problemas inflamatorios de articulaciones, eczema, enfermedades parasitarias de la piel, resfríos y otras [1-4].

Los principales compuestos responsables del color y la actividad en la cúrcuma son de tipo fenólico y se conocen como curcuminoides: curcumina (1), desmetoxicurcumina (2) y bisdesmetoxicurcumina (3) [3-5]. La variación de estos metabolitos determina en mucho la calidad y aceptación de los productos que contienen el rizoma y está relacionada principalmente con los diversos genotipos, así como las condiciones de cultivo, procesamiento y almacenamiento [6-7]. Para el análisis de curcuminoides se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos y cromatográficos como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector ultravioleta (CLAR-UV), la cromatografía de capa fina de alta resolución (CCFAR), la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (CL-EM) y cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG-EM); métodos que tienden a ser laboriosos y requieren de tiempo para obtener los resultados. Alternativamente, se ha propuesto el uso de la cuantificación de los curcuminoides mediante resonancia magnética nuclear (RMN) como una herramienta mucho más sencilla, rápida, mucho más exacta y precisa, que lleva a resultados mucho más reproducibles que los datos obtenidos por métodos de CLAR [8-11].

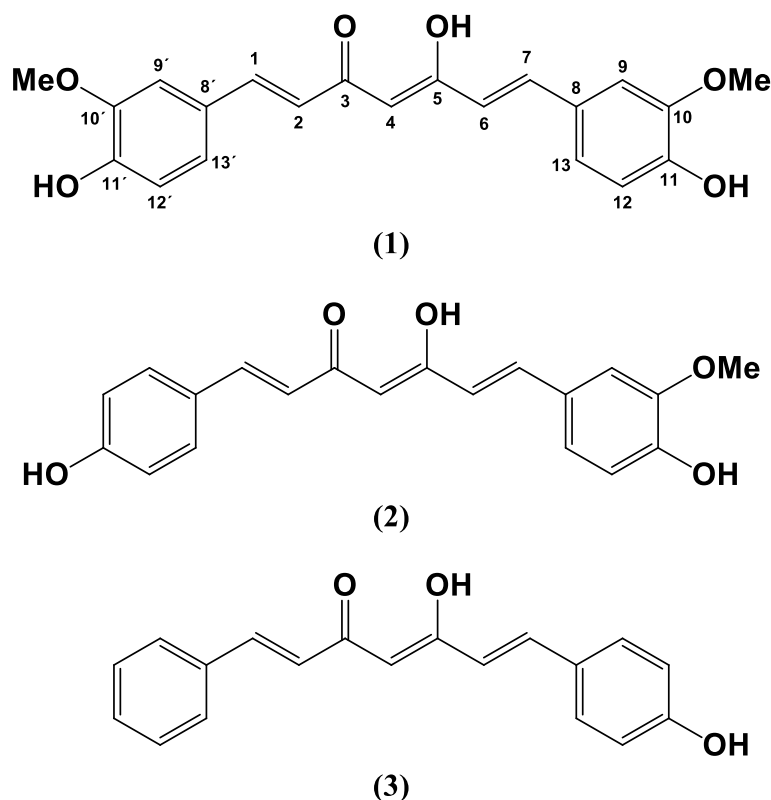


FIGURA 1. Principales curcuminoides presentes en cúrcuma.

En Costa Rica la producción de cúrcuma ha sido variable. Según comenta Soto, al final del siglo pasado se establecieron algunas plantaciones que luego fueron abandonadas debido a la ganadería [12]. Sin embargo, aunque no se cuenta con un censo específico de la producción de cúrcuma en el país, se tiene entendido que se ha continuado con la producción en pequeña escala

Como se comentó previamente, la composición de curcuminoides varía y esta variación puede afectar la aceptación del producto final en el mercado, y por lo tanto las ganancias de los productores, dado que la calidad del producto se determina por la concentración de ellos, especialmente de la curcumina. Por lo anterior, se hace necesario un método para establecer rápidamente la presencia de dichos metabolitos, para poder asegurar la calidad del producto y tener un mejor control que permita mejorar las prácticas de producción. En este trabajo se pretende determinar la composición de curcuminoides en cúrcuma cosechada en el país en el año 2012 así como en productos con base en cúrcuma vendidos en el comercio local, utilizando para ello el espectro $^1\text{H-RMN}$ de extractos de los productos a evaluar.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales, Disolventes, Estándares y Equipo

La separación de compuestos por cromatografía de columna se llevó a cabo con gel de sílice 60 mallaje de 140-230 (Merck, Alemania) y para seguimiento se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 con indicador F254 (Merk, Alemania). Cuando se hizo necesario, los extractos y disoluciones se filtraron con papel Whatman #40 (Whatman International Ltd., Reino Unido).

Se utilizaron disolventes de varios proveedores. El etanol de FANAL (FANAL, Costa Rica) su uso bidestilado; el metanol y hexanos de la marca J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Estados Unidos) y cloroformo de la marca SIGMA (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos), todos calidad reactivo A.C.S., se usaron directamente. Dimetilsulfóxido- d_6 de varios proveedores, Uvasol de la marca Merck (E. Merck, Alemania), de la marca Acros (Acros Organics, Estados Unidos) y con 1 % de TMS de la marca SIGMA (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos), se utilizó para la obtención de los espectros protónico en el equipo de RMN.

La cafeína que se empleó como estándar interno fue suministrada por la proveeduría de la Escuela de Química y se recrystalizó en 2-propanol A.C.S. grado espectrofotométrico de SIGMA (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).

Para pesar cantidades mayores a 1 g se utilizó una balanza modelo EK-2000i (A&D Company Limited, Japón), para superiores a los 100 mg se empleó una balanza analítica modelo HM-200 (A&D Company Limited, Japón) y para cantidades menores a los 50 mg se usó una balanza de 5 decimales modelo H51AR (Mettler Toledo; Estados Unidos). Las extracciones se realizaron en un baño ultrasónico modelo Branson 5510 (Branson Ultrasonics Corporation, Estados Unidos), mientras que los extractos se evaporaron en un evaporador rotatorio modelo 011 (Büchi, Suiza). Para la agitación de disoluciones y extractos se usó un vortex modelo Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Estados Unidos); para la centrifugación en tubos de ensayo se usó una centrífuga modelo Piccolo (Heraeus, Alemania) y en tubos eppendorf se empleó una microcentrífuga modelo Minispin Plus (Eppendorf AG, Alemania). Los espectros se midieron en un espectrómetro Bruker modelo Ascend de 600 MHz con una consola Advance III (Bruker, Alemania) y se usó una sonda triple inversa TXI 600 MHz S3 de 1.7mm o una sonda BBO 600 MHz S3 de 5 mm, ambas con gradiente en Z y producidas por Bruker.

Material Vegetal y Muestras Comerciales

Se usaron dos muestras de rizoma molido de cúrcuma suministradas y traídas al CIPRONA por parte de uno de los productores de la zona norte de Costa Rica. La primera muestra (M1) se cultivó en San Josecito de San Carlos, mientras que la segunda (M2) provenía de Chilamate de Sarapiquí, ninguna de ellas brindaba mayores detalles sobre el cultivo y su post-producción. Las muestras se homogenizaron y se tomaron submuestras para los procesos de extracción, cuando se requería. Por otro lado, se adquirieron cuatro muestras de cúrcuma comercial (CCM-1 a CCM-4) y ocho muestras de curry (CRR-1 a CRR-8) en varios comercios en los alrededores de San Pedro de Montes de Oca y los alrededores de Mercedes Sur de Heredia.

Aislamiento de Curcuminoides de Referencia

La cúrcuma se extrajo modificando lo que describe Sandur [13]. Específicamente, se pesaron 104,8 g de rizoma molido de la muestra M1 y se colocó en un Erlenmeyer de 2 L. Luego se adicionó 1 L de etanol 95 % y se extrajo en el baño ultrasónico por 30 minutos. Una vez terminada la extracción, la mezcla se dejó reposar unos minutos, se filtró por papel Whatman #40 y se repitió de nuevo el proceso de extracción tres veces más. Los extractos etanólicos se concentraron en un evaporador rotatorio y a la oleorresina que quedó se le agregó hexano, la mezcla se guardó toda la noche en el congelador. Al día siguiente el extracto se decantó, se descartó el sobrenadante y se obtuvo un sólido rojizo (12,41 g).

Para la purificación de los curcuminoides se siguió lo descrito por Revathy con algunas modificaciones [14]. En este caso, se tomaron 5 g del sólido obtenido previamente y se disolvió con acetona y a la disolución se le agregaron 8 g de gel de sílice para preparar una cabeza de cromatografía, evaporando lentamente la mezcla en un evaporador rotatorio. La cabeza se colocó sobre una columna de 44,0 g de gel de sílice (23 x 2,5 cm) que se había acondicionado previamente con cloroformo 100 %; luego se comenzó a eluir lentamente con un gradiente creciente de cloroformo-metanol hasta llegar a una proporción de 95:5. El primer volumen de elución se descartó y las fracciones coloreadas se recolectaron en tubos de ensayo de 12 mL hasta la fracción 50. Las fracciones se valoraron por cromatografía delgada de gel de sílice 60, a pesar de no necesitar revelador debido al color de los compuestos, también se observaron bajo luz UV para definir donde se hallaban compuestos puros. Todas las fracciones con perfiles cromatográficos similares se unieron y se evaporaron en el evaporador rotatorio. La pureza e identidad de los compuestos se determinó por RMN. Al final se obtuvieron cuatro fracciones, un aceite amarillo brillante que consistía en una mezcla de compuestos sin identificar (0,28 g), curcumina como un sólido amorfo de color amarillo/naranja claro (2,45 g; cerca de 90 % de pureza), desmetoxicurcumina como un sólido naranja claro (0,43 g, cerca de 85 % de pureza) y bisdesmetoxicurcumina como un sólido naranja oscuro (0,59 g, cerca 90 % de pureza). Debido a que la pureza de los compuestos ya era aceptable para la identificación de las señales específicas de cada uno, ellos no se purificaron en mayor grado.

Extracción de Curcuminoides para Medición del Espectro RMN

Para obtener los extractos a medir en el equipo de RMN se usaron tres metodologías que se detallan a continuación:

Método A: en una balanza analítica se pesaron por triplicado cerca de 50,0 mg de material molido de rizoma en tubos de ensayo con tapa (Muestras M1 y M2). Al material se le agregaron 2,5 mL de etanol 95 % y luego se agitó hasta homogenizar en un vortex, se colocó en el baño ultrasónico y se extrajo por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de extracción, la muestra se centrifugó por 2 minutos a 4000 rpm y luego se filtró a través de algodón en una pipeta Pasteur.

Lo anterior se repitió dos veces más y luego, el extracto se concentró hasta sequedad en un multivapor. El extracto seco se pesó y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Método B: Similar al método A, sin embargo, se pesaron sólo cerca de 20,0 mg de material por réplica, la extracción se realizó con Metanol 100 % y cuando se tuvo el extracto seco se desengrasó con 1 mL de hexano. El extracto desengrasado se mantuvo refrigerado hasta su posterior uso.

Método C: De las muestras de rizoma (M1 y M2) y cúrcuma comercial (CCM-1 a CCM-4) se pesaron cerca de 10,0 mg de material molido en tubos eppendorf quintuplicados o triplicados, respectivamente. En el caso de las muestras de curry (CRR-1 a CRR-8) se pesaron cerca de 50 mg de material molido por triplicado. A cada réplica se le agregó directamente DMSO-d₆ (500 µL); la mezcla se agitó en el vortex por 30 segundos hasta homogenizar y luego se extrajo por 15 min en el baño ultrasónico. Una vez extraída, la muestra se centrifugó a 14500 rpm por 5 minutos y una alícuota del sobrenadante (400 µL) se pasó a un tubo de RMN de 5 mm.

Medición y Análisis de Espectros de RMN

Los extractos secos obtenidos mediante los métodos A y B se disolvieron en 50 µL de un patrón de cafeína y se le adicionaron 250 µL de DMSO-d₆, una vez homogenizada la disolución se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 14500 rpm. Posteriormente, 70 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo de RMN de 1.7 mm, y los espectros se midieron usando la sonda triple inversa. A los extractos del método C se les agregó una alícuota del patrón de cafeína (200 µL) a cada tubo y se mezcló muy bien hasta que la disolución quedó homogénea, luego los espectros se midieron en la sonda BBO. Las muestras de los métodos A y C se midieron utilizando la secuencia para medición del protón (zg30) con una ventana (sw) de 20 ppm, un tamaño del dominio de tiempo de 65K, un tiempo de demora en la relajación de 1 s y un número de acumulaciones de 256 para el método A y 128 para el método C, respectivamente. Las muestras obtenidas por el método B, se midieron usando una secuencia con supresión de agua por pulsos compuestos (zgcppr) con una ventana de 16 ppm, un tamaño del dominio de tiempo de 32K, tiempo de demora en la relajación de 2 s y un número de acumulaciones de 128. Los espectros se procesaron con el programa Topspin 3.0 de Bruker, se usó un lb de 0,3 y la fase y la línea base se corrigieron manualmente, el espectro se referenció a la señal residual del DMSO (2,50 ppm) y luego se hizo la integración de forma manual. Para normalizar el espectro se asignó un valor de 1 al área del estándar interno y en los espectros con mayor resolución (métodos A y C) se aplicó deconvolución de área para definir el área de cada pico correspondiente a los diferentes compuestos.

Los datos de área se transfirieron a una hoja de cálculo de Excel y se calculó la concentración de cada curcuminóide por correlación de las áreas de los picos de los compuestos con la concentración del estándar interno.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identidad de los curcuminoides aislados se estableció usando los desplazamientos químicos en los espectros ¹H-RMN (ver Cuadro I). En el mismo espectro se determinó que se aislaron los compuestos en una pureza de más del 80 %, por lo se usaron sin mayor purificación para comparar y determinar las señales correspondientes en el espectro del extracto de cúrcuma. Como se aprecia en la Figura 2, el espectro del extracto es bastante complejo; sin embargo, una expansión de escala entre 5,5 y 8,5 (ver Figura 3) muestra que esta zona está dominada mayoritariamente por la mezcla de los curcuminoides. Se observó que los otros compuestos presentes son menos polares pues se hayan presentes en la primera fracción de la separación, y

ellos no se identificaron al no ser de interés para este estudio. Por otro lado, se puede notar un pequeño corrimiento de la señal del estándar interno en las muestras, este cambio en la posición del protón de la cafeína es común para a una variación del pH en la disolución. Si se considera la mezcla del rizoma, este cambio de pH se puede deber a la interacción de todos los compuestos presentes, por lo que una posible mejora al método sería agregar un regulador de pH. A pesar del cambio en la cafeína, las señales correspondientes a los curcuminoides varían en mucho menor grado.

Para la determinación de los curcuminoides se consideraron los resultados previamente obtenidos por Gören para la cuantificación de curcumina en DMSO-d₆ [11]. En ese trabajo se usó curcumina pura y no el extracto crudo; por tal motivo, para el caso del rizoma se decidió probar tres métodos de extracción diferentes para ver si era posible establecer el más sencillo y que brindara el mejor espectro de RMN de la mezcla a cuantificar. En el método A se usó etanol debido a la solubilidad de la curcumina en este disolvente y se procede de forma similar a las etapas de extracción para separación de compuestos, de este modo, el método sirve como método de referencia. En el método B se modifica la extracción con metanol y se realiza desengrase para ver si se disminuyen la cantidad de interferencias por otros compuestos presentes en la mezcla. Por último, el método C se seleccionó por ser rápido y para evitar la descomposición de los compuestos a cuantificar, con el propósito de obtener un espectro más limpio. En la Figura 4 se observa la región de los curcuminoides para los extractos de la muestra M1 en los diferentes métodos. Todos los métodos producen patrones de señales muy similares, sin embargo para los métodos A y C se notó una mejor resolución de señales. Lo que posiblemente pudo haber alterado el espectro de las muestras donde se utilizó el método B, fue el desengrase: algo de la composición alteró la disolución y por tanto el grosor de las señales del protón en la posición 4. Además, en estos extractos también se observó mayor descomposición, posiblemente debido a que esta metodología requiere mayor tiempo de extracción. Por lo anterior, las señales para la mezcla de curcuminoides en el método B se tienden a juntar un poco y se disminuye la resolución para el análisis cuantitativo. Un mejor espectro se obtuvo con muestras procedentes del método C. El espectro proveniente del extracto del método A, presenta señales de descomposición y la disolución se observó un poco más oscura que en el caso del método C.

Para las muestras A y C, el análisis cuantitativo se realizó por deconvolución de las áreas correspondientes a los protones en la posición 4. En este caso, el programa identifica los picos presentes bajo un área específica y realiza una simulación que ajusta lo mejor posible las señales que se encuentran representados bajo esa área, y al final subdivide el área total en sus componentes (ver figura 5). Por otro lado, dado que las muestras del método B, presentan señales traslapadas para desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina, ellas se analizaron de forma alternativa. Primero se establecieron regiones en el espectro ¹H-RMN correspondientes a las combinaciones de señales de los curcuminoides (ver Cuadro V en el apéndice). Como se observa en la ecuación A1, la concentración de curcumina se determinó directamente a partir del área de la región 2 y la concentración de desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina por las ecuaciones A2 y A3 para las áreas de las regiones 7 y 8, debido a que estas regiones no presentan mezcla de señales de otros metabolitos presentes en la muestra. Los resultados para las muestras de rizoma producido en la zona norte de Costa Rica analizadas por los diferentes métodos se muestran en el Cuadro II. Se observaron mejores resultados en el método A, sin embargo, los resultados del método C fueron bastante similares (cerca del 92% del valor observado en el método A), sin embargo requirieron menor trabajo, materiales y tiempo, por lo que parece que dicho método sólo requiere de mayor desarrollo para que los resultados sean mucho más representativos y exactos. Además, esta metodología C podría ser muy importante para llevar a cabo estudios como el

monitoreo rápido de los cambios metabólicos debido a las diferencias de cosechas o cuando se requiera evaluar diferencias entre productos. Según los reportes de las proporciones de curcuminoides en la cúrcuma [7; 15-21], la curcumina se encuentra alrededor de 2.86 % en promedio en el rizoma, y dependiendo de la variedad y el cultivo sus valores oscilan en el rango de 0,66 % hasta más de 9 %. Lo anterior implica que por los resultados obtenidos aquí, la producción de curcuminoides en la cúrcuma de Costa Rica es muy cercana al promedio observado a nivel mundial. En el cuadro III se presentan los resultados obtenidos con las muestras de cúrcuma molida que se vende en los comercios locales. Se observó que la muestra con mayor cantidad de curcumina es la CCM-1, dicha muestra viene descrita en la etiqueta como que no es empacada en el país, sin embargo, esta y las otras muestras presentan resultados similares a otros observados por Tayyem en Estados Unidos [22], donde el rango de los valores observados varían desde 0,58 % a 3,14 %, y en promedio 1,51 % de curcumina en el producto seco. Por otro lado, en el cuadro IV se muestran los resultados del análisis de muestras de curry. La cuantificación de los curcuminoides en estas muestras presentó sus limitaciones debido a que fue evidente que la cantidad de cúrcuma es bastante pequeña, por lo que sólo la curcumina se presentó en cantidad suficiente para poder ser cuantificada por el método, o en algunos casos la presencia de otros componentes en la mezcla no permitió definir con claridad los otros curcuminoides. La mayoría de las etiquetas especifican a la cúrcuma entre sus ingredientes y la única que no la detalla dentro de sus componentes, no presentó cantidades de curcumina detectables. Esto puede deberse a que el curry es considerado una mezcla muy variable de especias que son las que confieren el aroma, sabor y color al producto y podría ser que se agregen otros tipos de productos coloreados como paprika para substituir a la cúrcuma. Comparando estos resultados con los obtenidos por Tayyem, se observa que la mayoría de los productos vendidos en el país está en el límite bajo, debido a que en dicho estudio observaron un rango de 0,05 % a 0,58 % con un promedio 0,28 %, y la muestra con mayor contenido corresponde a un producto importado de Estados Unidos.

Dado los resultados obtenidos, se puede concluir que un análisis que utilice el método C, es un método rápido para la determinación de curcuminoides en extractos crudos de cúrcuma (método C), el cual con un poco de mejoras se puede utilizar para la evaluación de la producción del rizoma y monitorear investigaciones que pretendan la mejora de la producción de los cultivos en el país. Por otro lado, también sería importante la validación posterior de la metodología.

CUADRO I. Asignación de los desplazamientos químicos (ppm) de los espectros ¹H-NMR de curcumina (1), desmetoxicurcumina (2) y bisdesmetoxicurcumina (3) medidos en DMSO-d₆. Entre paréntesis se muestra la multiplicidad y la J en Hz.

Posición	1	2	3
1	7,53 (d; 15,8)	7,53 (d; 15,5)	7,53 (d; 15,4)
2	6,73 (d; 15,8)	6,67 (d; 15,9)	6,67 (d; 15,9)
3	-	-	-
4	6,06 (s)	6,04 (s)	6,04 (s)
5	-	-	-
6	6,73 (d; 15,8)	6,73 (d; 15,8)	6,67 (d; 15,9)
7	7,53 (d; 15,8)	7,52 (d; 15,7)	7,53 (d; 15,4)
8, 8'	-	-	-
9	7,29 (d; 1,7)	7,29 (d; 1,7)	7,55 (d; 8,5)
9'	7,29 (d; 1,7)	7,55 (d; 8,6)	7,55 (d; 8,5)
10	-	-	6,81 (d, 8,6)

10'	-	6,81 (d, 8,0)	6,81 (d, 8,6)
11, 11'	-	-	-
12	6,81 (d; 8,2)	6,81 (d, 8,0)	6,81 (d, 8,6)
12'	6,81 (d; 8,2)	6,81 (d, 8,0)	6,81 (d, 8,6)
13	7,13 (dd, 8,2; 1,7)	7,13 (dd, 8,2; 1,7)	7,55 (d; 8,5)
13'	7,13 (dd, 8,2; 1,7)	7,55 (d; 8,6)	7,55 (d; 8,5)
OMe	3,82 (s)	3,82 (s)	-

CUADRO II. Concentración (%m/m, $X \pm sd$)⁻ de curcuminoides en rizoma de cúrcuma molido producido en la zona norte de Costa Rica determinados por RMN

Muestra	M1			M2		
	A	B	C	A	B	C
Curcumina	2,63 ± 0,07	2,3 ± 0,3	2,41 ± 0,09	2,91 ± 0,05	2,8 ± 0,2	2,67 ± 0,04
Desmetoxicurcumina	0,75 ± 0,07	1,0 ± 0,4	0,74 ± 0,03	0,92 ± 0,03	1,5 ± 0,3	0,84 ± 0,03
Bisdesmetoxicurcumina	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,61 ± 0,03	0,81 ± 0,04	0,6 ± 0,2	0,65 ± 0,03

CUADRO III. Concentración (%m/m, $X \pm sd$)⁻ de curcuminoides determinados en muestras de cúrcuma comercial por RMN

Muestra	CCM-1	CCM-2	CCM-3	CCM-4
Curcumina	1,7 ± 0,1	0,54 ± 0,04	1,63 ± 0,06	0,6 ± 0,1
Desmetoxicurcumina	0,55 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,48 ± 0,02	0,18 ± 0,03
Bisdesmetoxicurcumina	0,43 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,10 ± 0,02

CUADRO IV. Concentración (%m/m, $X \pm sd$)⁻ de curcumina en muestras de curry comercial por RMN determinada

Muestra	CRR-1	CRR-2	CRR-3	CRR-4	CRR-5	CRR-6	CRR-7	CRR-8
Curcumina	0,027 ± 0,003	ND ^a	0,083 ± 0,005	0,077 ± 0,003	0,039 ± 0,002	0,124 ± 0,002	0,41 ± 0,06	0,010 ± 0,006

^a: No detectado

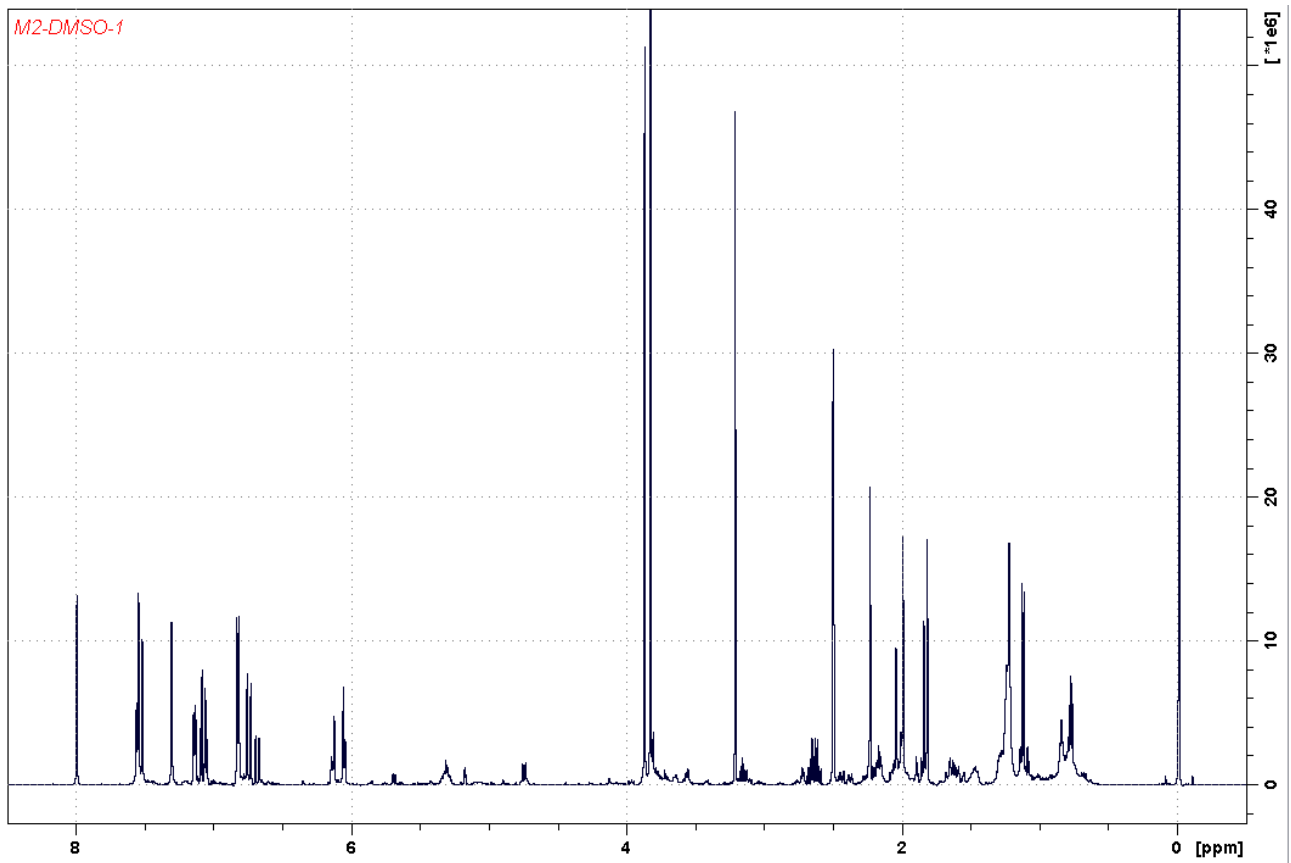


FIGURA 2. Espectro 1H-RMN en DMSO-d6 para la muestra M2.

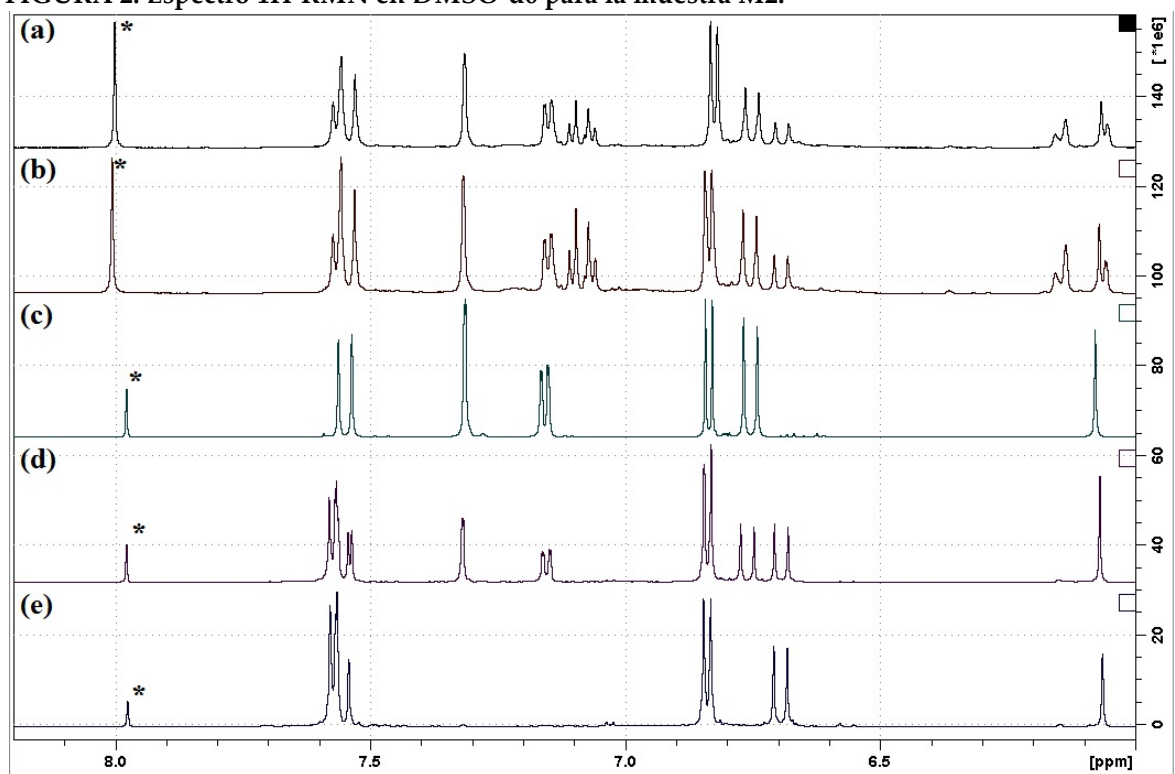


FIGURA 3. Expansión del espectro de RMN mostrando las principales señales de los curcuminoides para las muestras analizadas y los curcuminoides aislados. (a) muestra M1, (b) muestra M2, (c) curcumina, (d) desmetoxicurcumina y (e) bisdesmetoxicurcumina. Con asterisco (*) se muestra la señal del estándar interno de cafeína.

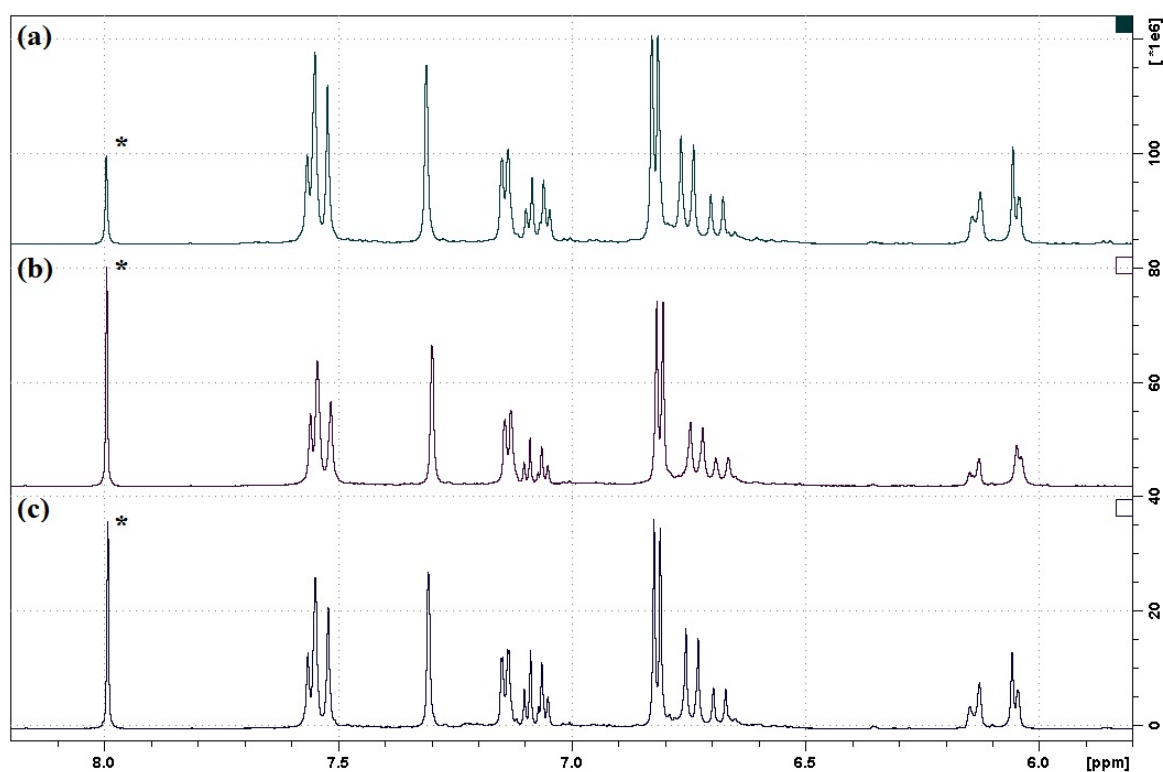


FIGURA 4. Expansión del espectro de RMN mostrando las principales señales de los curcuminoides para los diferentes método usados con la muestra M1. (a) método A, (b) método B y (c) método C. Con asterisco (*) se muestra la señal del estándar interno de cafeína.

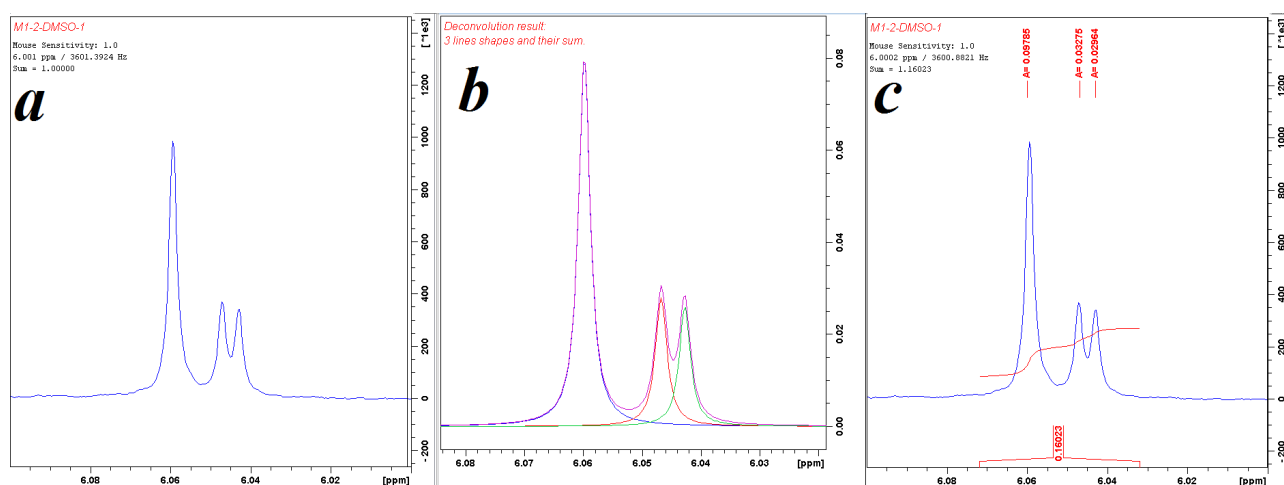


FIGURA 5. Expansión del espectro de RMN mostrando el proceso de deconvolución del área para las señales de los curcuminoides en la posición 4. (a) espectro original, (b) ajuste de deconvolución de las señales y (c) resultado de la separación del área luego del ajuste.

IV. REFERENCIAS

- [1] Plotto, A. TURMERIC: Post-Production Management. Mazaud, F.; Röttger, A.; Steffel, K. (Eds), 2004, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Turmeric.pdf.

- [2] Ravindran, P.N. Turmeric - The Golden Spice of Life. In: Nirmal Babu, K.; Ravindran, P.N.; Sivaraman, K. (Eds), Turmeric. The genus Curcuma, CRC Press: Boca Ratón, 2007, pp 1-13.
- [3] Sharma, R.A.; Gescher, A.J.; Steward W.P. *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 1955-1968.
- [4] Araújo, C.A.C.; Leon, L.L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2001**, 96, 723-728.
- [5] Nahar, L.; Sarker, S.D. Phytochemistry of the Genus Curcuma. In: Nirmal Babu, K.; Ravindran, P.N.; Sivaraman, K. (Eds), Turmeric. The genus Curcuma, CRC Press: Boca Ratón, 2007, pp 71-106.
- [6] Bambilra, M.L.A.; Junqueira, R.G.; Glória, M.B.A. *Brazilian Arch. Biol. Tech.* **2002**, 45, 423-429.
- [7] Li, S.; Yuan, W.; Deng, G.; Wang, P.; Yang, P.; Aggarwal, B.B. *Pharmaceutical Crops* **2011**, 2, 28-54.
- [8] Paramasivam, M.; Wasim Aktar, M.; Poi, R.; Banerjee, H.; Bandyopadhyay, A. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2008**; 3, 55-58.
- [9] Veni Nagappan, K.; Meyyanathan, S.N.; Rajinikanth, B.R.; Kannan, E. A. *Asian J. Res. Chem.* **2009**, 2, 115-118.
- [10] Jayaprakasha, G.K.; Rao, L.J.M.; Sakariah, K.K. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3668-3672.
- [11] Gören, A.C.; Çikrikçi, S.; Çergel, M; Bilsel, G. *Food Chem.* **2009**, 113, 1239-1242.
- [12] Soto, G.A.; Cover, P.; Quintanilla, E.; Pazos, L. *Agronomía Costarricense* **2004**, 28, 107-111.
- [13] Sandur, S.K.; Pandey, M.K.; Sung, B.; Ahn, K.S.; Murakami, A.; Sethi, G.; Limtrakul, P.; Badmaev, V.; Aggarwal, B.B. *Carcinogenesis* **2007**, 28, 1765-1773.
- [14] Revathy, S.; Elumalai, S.; Benny, M.; Antony, B. *J. Exp. Sci.* **2011**, 2, 21-25.
- [15] Ravindran, P.N.; Nirmal Babu, K.; Shiva, K.N. Botany and Crop Improvement of Turmeric. In: Nirmal Babu, K.; Ravindran, P.N.; Sivaraman, K. (Eds), Turmeric. The genus Curcuma, CRC Press: Boca Ratón, 2007, pp 15-70.
- [16] Souza, C.R.A.; Glória, M.B.A. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **1998**, 41, 218-224.
- [17] Paramasivam, M.; Wasim Aktar, Md.; Poi, R.; Banerjee, H.; Bandyopadhyay, A. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2008**; 3: 55-58.
- [18] Jayaprakasha, G.K.; Jagan Mohan Rao, L.; Sakariah, K.K. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3668-3672.
- [19] Gupta, A.P.; Gupta, M.M.; Kumar, S. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **1999**, 22, 1561-1569.
- [20] Barrero, M.; R.J. Carreño. *Agronomía Tropical.* **1999**, 49, 491-504.
- [21] Ríos, E.; Duque, A.L.; León, D.F. *Rev. Invest. Univ. Quindío* **2009**, 19, 18-22.
- [22] Tayyem, R.F.; Heath, D.D.; Al-Delaimy, W.K.; Rock, C.L. *Nutrition and Cancer* **2006**, 55, 126-131.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) por su colaboración y aporte en la realización de este trabajo.

APÉNDICE

CUADRO V. Regiones establecidas en el espectro $^1\text{H-RMN}$ del extracto de cúrcuma para la cuantificación de curcuminoides y su correspondencia con los moles de protones de los diferentes curcuminoides presentes en las regiones.

Región	Rango/ ppm	Correspondencia ^a
1	6,05-6,00	$n_{DMC} + n_{BD}$
2	6,09-6,05	n_C
3	6,72-6,66	$n_{DMC} + 2 * n_{BD}$
4	6,78-6,72	$2 * n_C + n_{DCM}$
5	6,87-6,78	$2 * n_C + 3 * n_{DMC} + 4 * n_{BD}$
6	7,18-7,11	$2 * n_C + n_{DCM}$
7	7,34-7,26	$2 * n_C + n_{DCM}$
8	7,61-7,49	$2 * n_C + 4 * n_{DMC} + 6 * n_{BD}$
9	8,03-7,95	EI

^a n_C : moles de curcumina, n_{DCM} : moles de demetoxicurcumina, n_{BD} : moles de bisdemetoxicurcumina, EI: estándar interno

Determinación de la concentración de curcumina

$$\text{Ecuación A1: } \%_{\text{curcumina}} = \left(\frac{A_2 * C_{n_{ei}} * V * PM_C}{m} \right)$$

Donde:

A_2 : es el área de la región 2

$C_{n_{ei}}$: es la concentración del estándar interno

V : el volumen total de la disolución del extracto

PM_C : peso molecular de la curcumina

m : masa de la submuestra de rizoma de cúrcuma

$$\text{Ecuación A2: } \%_{\text{demetoxicurcumina}} = \left(\frac{(A_7 - 2 * A_2) * C_{n_{ei}} * V * PM_{DMC}}{m} \right)$$

Donde:

A_2 : es el área de la región 2

A_7 : es el área de la región 7

$C_{n_{ei}}$: es la concentración del estándar interno

V : el volumen total de la disolución del extracto

PM_{DCM} : peso molecular de la demetoxicurcumina

m : masa de la submuestra de rizoma de cúrcuma

$$\text{Ecuación A3: } \%_{\text{bisdemetoxicurcumina}} = \left(\frac{(A_8 - 2 * A_2 - 4 * (A_7 - 2 * A_2)) * C_{n_{ei}} * V * PM_{BD}}{6 * m} \right)$$

Donde:

A_2 : es el área de la región 2

A_7 : es el área de la región 7

A_8 : es el área de la región 8

$C_{n_{ei}}$: es la concentración del estándar interno

V : el volumen total de la disolución del extracto

PM_{BD} : peso molecular de la bisdemetoxicurcumina

m : masa de la submuestra de rizoma de cúrcuma