

# Estudo químico e biológico da fração diclometânica da espécie *Croton echioides*

## *Chemical and biological study of the dichloromethane fraction of Croton echioides species*

Matheus Farinhuk\*, Cláudio Roberto Novello †

### RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que se mostra cada vez mais presente pelo aumento da expectativa de vida. Seus sintomas são severos e não possuem métodos satisfatórios de tratamento devido a sua complexidade. Os fármacos mais comuns para o tratamento da DA funcionam através do mecanismo de inibição da enzima AChE. Uma alternativa promissora para o tratamento da DA é o uso de plantas medicinais, bem como compostos isolados e frações obtidas destas. Uma classe de compostos químicos naturais que têm demonstrado atividade anticolinesterásica são os alcaloides. Os alcaloides podem ser encontrados em diversos gêneros de plantas, sendo o gênero *Croton* uma rica fonte. *Croton echioides* Baill. (Euphorbiaceae), popularmente conhecido por quebra-faca, caatinga branca e velame, apresenta-se como uma arvoreta nativa encontrada na região Nordeste do Brasil. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de alcaloides bioativos quanto à atividade anticolinesterásica *in vitro* a partir do *Croton echioides*. Através do fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica, obtida a partir do extrato bruto do caule de *C. echioides*, foram isoladas as amostras CED-74.15.46 e CED-74.14, as quais foram testadas quanto a atividade de inibição da enzima AChE, entretanto não se mostraram ativas.

**Palavras-chave:** Alzheimer, alcaloides, *Croton echioides*.

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that is increasingly present due to the increase in life expectancy. Its symptoms are severe and do not have satisfactory methods of treatment due to its complexity. The most common drugs for the treatment of AD work through the AChE enzyme inhibition mechanism. A promising alternative for the treatment of AD is the use of medicinal plants, as well as isolated compounds and fractions obtained from them. A class of natural chemical compounds that have shown anticholinesterase activity are the alkaloids. Alkaloids can be found in several plant genre, with the *Croton* genus being a rich source. *Croton echioides* Baill. (Euphorbiaceae), popularly known as quebra-faca, caatinga branca and velame, is a native plant found in the Northeast region of Brazil. This work aimed to isolate and characterize bioactive alkaloids for *in vitro* anticholinesterase activity from *Croton echioides*. Through chromatographic fractionation of the dichloromethane fraction, obtained from the crude extract of the stalk of *C. echioides*, samples CED-74.15.46 and CED-74.14 were isolated, which were tested for the inhibition activity of the AChE enzyme, however not have shown itself be active.

**Keywords:** Alzheimer, Alkaloids, *Croton echioides*.



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se dado mais atenção as doenças relacionadas ao aumento da expectativa de vida da população. Tem se mostrando cada vez mais presente doenças relacionadas com o aumento de idade a hipertensão, osteoporose, câncer, diabetes, depressão e diversos outros problemas que surgem pela crescente fragilidade do corpo (JAUL; BARRON, 2017). Dentre estas doenças, a doença de Alzheimer (DA) vem se mostrando extremamente danosa, sendo que em 2019 foi a sétima maior causa de morte no mundo segundo a OMS (WHO, 2019).

A DA foi primeiramente descrita em 1906 como um distúrbio neurodegenerativo do cérebro por Alois Alzheimer. A partir deste ponto começaram pesquisas para o tratamento da doença, mas sendo apenas depois de 70 anos do seu descobrimento foi reconhecida como uma causa de demência e morte (KATZMAN, 1976). Os sintomas vão aparecendo conforme o prejuízo sofrido pelos neurônios, sendo que no início a pessoa ainda é capaz de realizar suas atividades do dia-a-dia, porém com uma menor eficiência. Nos estágios mais moderados, também sendo eles os mais longos, a pessoa começa a ter dificuldade em realizar sua rotina, passa por uma alteração de seus comportamentos e de sua personalidade, se tornando também mais agitada e desconfiada. Nos seus estágios mais avançados, o indivíduo é incapaz de viver sem ajuda para realizar as tarefas mais básicas. Sua capacidade de se comunicar é muito prejudicada e se tem a necessidade ficar a maior parte do tempo na cama devido a áreas afetadas no cérebro pelo movimento. Por fim devido todas as dificuldades, a doença acaba levando a obito (ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.*, 2018).

A DA atualmente é caracterizada principalmente pela acumulação de placas beta-amilóide na parte externa dos neurônios, dificultando a comunicação entre os neurônios na sinapse, e de uma proteína, conhecida como tau, na parte interna das células nervosas, causando um impedimento na obtenção de nutrientes nas células, causando com o tempo então a morte das mesmas (PANZA *et al.*, 2019). Devido à alta complexidade nos fatores que desencadeiam sua aparição, ainda é desconhecido métodos que sejam capazes de diminuir ou parar sua progressão. As drogas que são utilizados para a DA são os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que funcionam melhorando os sintomas do paciente, sendo capazes de reduzir a eficiência da enzima que cliva o neurotransmissor acetilcolina, podendo ter um aumento do hormônio no cérebro (ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.*, 2018).

A tacrina foi o primeiro fármaco utilizado para o tratamento na doença de Alzheimer, sendo descrito pela primeira vez em 1961 e então aprovada como uma droga em 1993 (KNAPP *et al.*, 1994). Mas devido a sua toxicidade, foi necessário a busca por novos anticolinesterásicos eficientes, porém apenas novos quatro remédios surgiram e são utilizados, sendo esses donepezila, galantamina, revastigmina e memantina, que foi a última descrita em 2003 (COSTA *et al.*, 2015). Com isso, se mostra necessário a busca de novos fármacos capazes de ter uma melhor inibição.

Uma classe de substancias que se destacam pela inibição da AChE são os alcaloides (KONRATH *et al.*, 2013). Os alcaloides se mostram eficientes na inibição da enzima acetilcolinesterase por esta ter seu sítio ativo possuindo afinidade com cadeias nitrogenadas, sendo então uma boa forma bloquear seu funcionamento (KONRATH *et al.*, 2013).

Dentre os gêneros de planta em que podemos encontrar os alcaloides no território brasileiro, destaca-se o gênero *Croton*, que é um dos maiores gêneros da família Euphorbiaceae, abrangendo um número considerável de espécies no mundo. As espécies deste gênero chamam a atenção pela diversidade de uso popular e de atividade biológica, explicado pela grande diversidade de compostos ativos encontrados nelas. Estas espécies são promissoras segundo a perspectiva química e medicinal e tem atraído grande interesse no seu estudo (SILVA *et al.*, 2009; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

*Croton echinoides* Baill., é uma arvoreta nativa encontrada na região Nordeste do Brasil (BARBOSA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Os caules desta planta são extensivamente comercializados como tônico e



afrodisíaco em substituição das raízes da marapuama amazônica, *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae) tanto no Brasil como no exterior (NOVELLO *et al.*, 2012).

Assim, este trabalho teve como objetivo a purificação da fração diclorometânica obtido da planta *Croton echioides*, para se isolar e identificar alcaloides presentes e realizar testes *in vitro* sobre a capacidade na inibição da enzima AChE, na busca por uma molécula promissora no tratamento da DA.

## 2 MÉTODO

**Cromatografia.** Foram utilizadas colunas cromatográficas preparadas segundo os procedimentos descritos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997) utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 de 70-230 mesh (Merck). Como fase móvel foram utilizados solventes puros ou mistura destes para se obter polaridade ideal para cada fração a ser cromatografada. As dimensões de coluna e volumes coletados foram selecionados de acordo com a quantidade de material a se separar.

**Cromatografia em camada delgada.** Foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel GF254 (Merck) que posteriormente reveladas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e pela utilização de reveladores cromogênicos como o reagente de Dragendorff.

**Material vegetal.** Caules secos de *C. echioides* (CE) (10 kg) foram adquiridos da empresa distribuidora e comercializadora de matérias-primas vegetais IDEALFARMA, com sede na cidade de São Paulo-SP. Excisatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS 139049).

**Isolamento.** A extração do caule de *C. echioides* foi realizada por turbólise com solvente hidroalcoólico 70% (p/p). Parte do EB (300 g) foi ressuspenso em 2,5 L de água e submetido à partição líquido-líquido em proporção volumétrica com *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol de acordo com (HASAN *et al.*, 2000). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, liofilizadas e denominadas de CEH, CED, CEAE, CEB e CEAQ, respectivamente. Foram cromatografados 39,17 g da CED em CLV (Ø 5,5 x 31 cm) a vácuo contendo gel de sílica 60 (70-230 mesh) eluída com *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e água combinados em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 76. As frações obtidas foram analisadas por CCD, reveladas com reagente de Dragendorff e renomeadas como CED-01 a CED-76. Foram realizadas extrações de alcaloides totais com 1,0 g das junções entre as frações nomeadas como CED-74. Foi colocado em um béquer com 30 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L e misturado até a homogeneização. Foi então adicionado a fração ácida a um funil de separação e foram realizadas 4 lavagens com acetato de etila. A fração ácida então foi armazenada novamente em um béquer e neutralizada com hidróxido de amônio até pH 7. Foi realizado então uma CCD com as frações originais, a fração ácida e a fração acetato, utilizando-se o reagente de Dragendorff como revelador. 200 mg da fração neutralizada foram cromatografadas utilizando-se HSCCC, utilizando sistema cauda-cabeça em uma coluna de 350 mL. A móvel consistiu de acetato de etila e *n*-butanol e a fase estacionária foi a aquosa numa proporção de 3:1:4 respectivamente. A amostra foi solubilizada em 3 mL da fase estacionária e injetada na coluna. A corrida foi iniciada a 650 RPM com fluxo de 1,5 mL/min da fase móvel. Foram coletados 15 frações que foram analisadas em CCD, utilizando reagente de Dragendorff como revelador e posteriormente renomeadas como CED-74.01 a CED-74.15. A partir da observação das CCD das frações obtidas da fração CED-74, optou-se por purificar a CED-15 (22,6 mg) em coluna aberta (Ø 0,8 x 22 cm) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh). A coluna foi eluída com clorofórmio e metanol puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 62 frações que foram analisadas em CCD utilizando-se reagente de Dragendorff como revelador e juntadas em 5 novas frações foram separadas duas amostras, nomeadas como CED-72.15.46 e CED-72.14.

**Atividade enzimática (AChE).** Para a reação enzimática no ensaio com microplaca de 96 poços, utilizou-se leitora de microplacas com absorvância ajustada a 405 nm. Nas cavidades da placa, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetilcolina 15 mM, 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM; 50 µL de tampão



Tris/HCl 50 mM pH 8, contendo 0,1% de BSA. 25  $\mu$ L foram pipetados das amostras a ser analisada e da tacrina em triplicada, posteriormente realizando diluição seriada para cada uma das triplicatas das testadas; foram então adicionados 25  $\mu$ L da enzima (0,22 U/mL); foi medida a absorbância a cada 20 s por 7 vezes ao fim, os resultados foram analisados e os IC50 foram calculados.

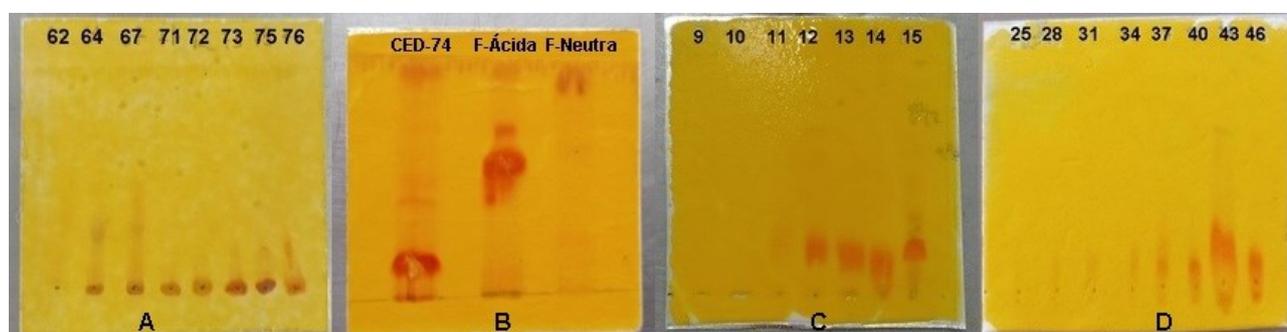
### 3 RESULTADOS

A Fração CED foi cromatografada em coluna de sílica gel e as frações obtidas foram reveladas com reagente de Dragendorff que, quando positivo para alcaloides cora a banda de vermelho. Notou-se que a concentração de alcaloides foi maior nas ultimas frações da coluna, que são as mais polares entre as demais. A figura 1 mostra a CCD apenas das últimas frações (62 a 76), pois as frações anteriores (1 a 61) não apresentaram resultado positivo.

A extração ácido-base foi realizada na fração CED-74 com o intuito de se obter uma fração enriquecida com alcaloides na fração ácida. O resultado pode ser visualizado na Fig. 2 que mostra a CCD revelada com reagente de Dragendorff. Observa-se a banda da CED-74 antes da extração, a fração ácida (F-Ácida) que foi a resultante da extração com HCL e a fração neutra (F-Neutra) resultante da extração com acetato de etila. É possível perceber que a fração CED-74 era bem rica em alcaloides e que estes foram substancialmente extraídos e concentrados na F-Ácida. A F-Neutra, como esperado, continha baixa concentração de alcaloides. Desta forma, F-Ácida, após neutralizada, foi submetida a um novo fracionamento em cromatografia de contracorrente (HSCC) para se purificar os alcaloides presentes.

A cromatografia em contracorrente (HSCC) foi escolhida em busca de uma separação mais eficiente dos alcaloides de alta polaridade presentes na fração. Este tipo de cromatografia é bastante versátil pois pode se escolher entre o modo normal ou reverso de eluição. Foi escolhido a água destilada como fase estacionaria por sua alta polaridade capaz de reter de maneira satisfatória os alcaloides. Acetato e *n*-butanol foram utilizados em mistura como fase móvel. A polaridade foi adequada para que os alcaloides pudessem ser eluídos seletivamente, obtendo-se uma boa separação em fase reversa. As frações obtidas foram aplicadas em CCD reveladas com reagente de Dragendorff (Fig. 3). Como esperado, com os alcaloides foram eluídos nas últimas frações da corrida. A fração 15 foi escolhida dentre as demais frações para dar prosseguimento ao estudo por apresentar a maior quantidade em massa. Entretanto, como ainda apresentava algumas impurezas, foi submetida a cromatografia em coluna para a purificação. A CCD pode ser observada na Figura 4 sendo que as frações de interesse foram da 37 a 46.

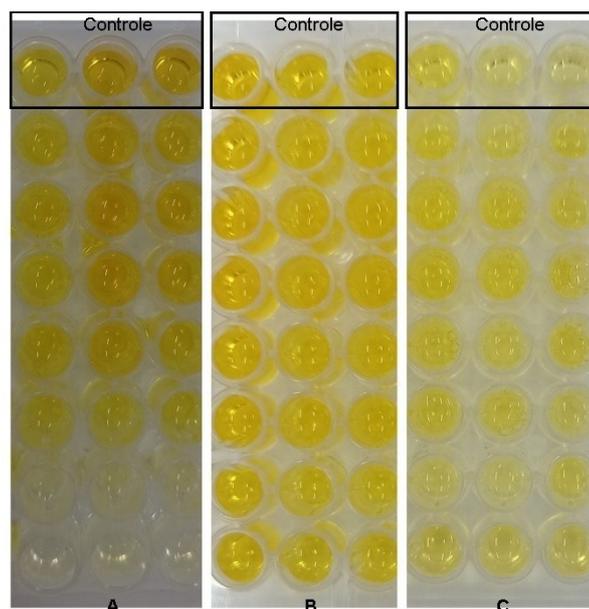
**Figura 1 – CCDs reveladas com Reagente de Dragendorff (A) frações 62 a 176 da CED, na segunda (B) as frações CED-74, F-Ácida e F-Neutra da CED-74, na terceira (C) as frações 9 a 15 da fração F-Ácida, na quarta (D) a frações 25 a 46 da CED-74.15**



Fonte: Autoria própria (2021)

As frações CED-74.15.46 e CED-74.14 foram submetidas ao teste anticolinesterásico. A tacrina foi utilizada como referência por ser uma substância conhecida por seu alto grau de inibição da AChE (KNAPP *et al.*, 1994). Como pode ser notado na Fig. 5 (A) onde foi testada a tacrina em triplicata, nos poços de maior concentração a inibição aconteceu quase que completamente, comprovado pela ausência da cor amarela, em comparação com a triplicata do controle, sem a presença de inibidor, onde todos os poços estão completamente corados. A tacrina apresentou um  $IC_{50}$  de  $31,3 \pm 0,002 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras CED-74.15.46 e CED-74.14, no entanto não apresentaram inibição, como pode ser observado na Fig. 5 (B) e na Fig. 5 (C).

**Figura 2 – Microplacas possuindo na primeira imagem (A) Tacrina, na segunda (B) a CED-74.15.46 e a última (C) a CED-74.14**



Fonte: Autoria própria (2021)

Desta forma as substâncias CED-74.15.46 e CED-74.14 não se mostraram ativas para a inibição da enzima acetilcolinesterase. As mesmas também foram enviadas para análise de RMN para posterior determinação estrutural, mas devido ao agravante da pandemia de COVID-19 as análises ainda não puderam ser feitas.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que os métodos de isolamento funcionaram de maneira eficiente, principalmente relacionado a extração ácido base, onde se pode ter uma extração quase completa dos alcaloides presentes para a fração de interesse. As purificações em coluna foram eficientes no isolamento dos alcaloides de interesse. Pela presença dos alcaloides em frações mais polares, é possível determinar também que as frações mais polares do EB devem ter uma presença significativa de novos alcaloides.

É possível determinar então pelo teste realizado em *in vitro* de inibição da AChE que os alcaloides em maior concentração na fração diclorometânica não foram ativos, demonstrando não ser interessante para o tratamento da doença de Alzheimer. Entretanto, ainda existe a presença de diferentes alcaloides em frações mais polares como a butanolica, que será estudada futuramente quanto ao seu potencial químico e biológico.

Futuramente também serão feitas as determinações estruturais das amostras ali presentes através de RMN, alcançando um maior conhecimento sobre os metabólicos presentes na planta *Croton echinoides*.



## AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela bolsa fornecida, ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-PROPPG da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos recursos financeiros. Ao campus da UTFPR de Francisco Beltrão por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.

## REFERÊNCIAS

- JAUL, Efraim; BARRON, Jeremy. Age-related diseases and clinical and public health implications for the 85 years old and over population. **Frontiers in public health**, v. 5, p. 335, 2017.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>. Acesso em: 01 set. 2021
- KATZMAN, Robert. The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: a major killer. **Archives of neurology**, v. 33, n. 4, p. 217-218, 1976.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION *et al.* 2018 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 3, p. 367-429, 2018.
- PANZA, Francesco, *et al.* A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 3, p. 73-88, 2019.
- KNAPP, Margaret J. *et al.* A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. **Jama**, v. 271, n. 13, p. 985-991, 1994.
- COSTA, Roberta D. F. *et al.* Aquisição de medicamentos para a Doença de Alzheimer no Brasil: uma análise no sistema federal de compras, 2008 a 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, p. 3827-3838, 2015.
- KONRATH, Eduardo L. *et al.* Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701-1725, 2013.
- SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria L. F.; NEGRI, Giuseppina. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007
- SILVA, Juliana S.; SALES, Margareth F.; CARNEIRO-TORRES, Daniela S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, PERNANBUCO, BRASIL. **Rodriguesia**. v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.
- BARBOSA, Patrícia S. *et al.* Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior Lanj.* **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 887-890, 2007.
- NOVELLO, Claudio R. *et al.* Morphoanatomy and pharmacognostic study of the wood of *Croton echinoides*, the Northeastern Marapuama. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, 2012.
- COLLINS, Carol. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed., Campinas: Editora Unicamp, 1997.
- HASAN, Choudhury. M. *et al.* Nasimaluns A and B: neo-clerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.410-411, 2000.