

BIOENSAIO DE ATIVIDADE MOLUSCICIDA ADAPTADO PARA A AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Nyéssia Fernanda de Sousa Silva¹
 Juliana Cogo¹
 Cleuza Conceição Pereira Wiepieski¹
 Antonio Laverde Jr.^{1,2}

SILVA¹, N. F. S., COGO¹, J., WIEPIESKI¹, C. C. P., LAVERDE JR.^{1,2}, Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 179-181, jul./dez. 2008.

RESUMO: Nesta nota é apresentada detalhadamente a metodologia (preparação dos extratos, adaptação dos caramujos, ensaio de atividade, destino dos caramujos) usada para a avaliação da atividade moluscicida de extratos de plantas frente a caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. A adaptação desta metodologia tem o propósito de avaliar extratos naturais para a busca de produtos alternativos mais baratos, biodegradáveis, seguros e disponíveis localmente, para o controle das populações de caramujos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade moluscicida. *Biomphalaria glabrata*. Bioensaio. Esquistossomose.

BIOASSAY OF MOLLUSCICIDAL ACTIVITY ADAPTED FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS

ABSTRACT: The methodology (extract preparation, adaptation of the snails, activity test, destiny of the snails) used for the evaluation of the molluscicidal activity of plant extracts in relation to snails from the *Biomphalaria glabrata* species appears in detail in this note. The adaptation of this methodology has the purpose of evaluating natural extracts in order to find cheaper, biodegradable, safe and easily available alternative products for the control of the populations of snails.

KEYWORDS: Molluscicidal activity. *Biomphalaria glabrata*. Bioassay. Schistosomiasis.

BIOENSAYO DE ACTIVIDAD MOLUSCICIDA ADAPTADO PARA EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES

RESUMEN: En este apunte se presenta detalladamente la metodología (preparación de los extractos, adaptación de los caracoles, ensayo de actividad, destino de los caracoles) utilizada para la evaluación de la actividad moluscicida de extractos de plantas frente a caracoles de la especie *Biomphalaria glabrata*. La adaptación de esta metodología tiene el propósito de evaluar extractos naturales para la búsqueda de productos alternativos más baratos, biodegradables, seguros y disponibles localmente, para el control de las poblaciones de caracoles.

PALABRAS CLAVE: Actividad moluscicida. *Biomphalaria glabrata*. Bioensayo. Esquistosomiasis.

Introdução

Moluscicidas são substâncias usadas para exterminar moluscos, especialmente caramujos que vivem e se alimentam de folhagens em estufas, jardins, lavouras e campos. Também são utilizados para controlar caramujos vetores de parasitos importantes em saúde pública. Os programas de controle que incluem o uso de moluscicidas estão voltados para o combate a moluscos transmissores da esquistossomose e de moléstias como a fasciolose, causada por *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae) e que tem como hospedeiro intermediário *Lymnaea* spp. (Gastropoda).

No Brasil, os hospedeiros intermediários do helminto parasito *Schistosoma mansoni*, responsável pela doença endêmica esquistossomose mansônica ("barriga d'água"), são moluscos do gênero *Biomphalaria* (Planorbidae). Das três espécies brasileiras hospedeiras intermediárias (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) do *S. mansoni*, a *B.*

glabrata é a mais importante, em decorrência de sua extensa distribuição geográfica, altos índices de infecção e eficiência na transmissão da esquistossomose. Além disso, sua distribuição quase sempre está associada à ocorrência da esquistossomose. A presença deste molusco já foi notificada em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal, e em 799 municípios da região sul, sudeste, centro-oeste e nordeste brasileiro (CARVALHO et al., 2005).

Os moluscicidas sintéticos são utilizados em programas de controle da esquistossomose, com o objetivo de combater os caramujos vetores. No momento, apenas uma substância sintética, a niclosamida, é recomendada pela Organização das Nações Unidas (ONU) como moluscicida (LEYTON et al., 2005). A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essas substâncias, a baixa seletividade que apresentam (atuando sobre outras espécies da fauna, podendo perturbar o equilíbrio ecológico local) e a procura por substâncias facilmente biodegradáveis

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde.

² Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências.

Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, 87502-210, Umuarama - PR - Fax: +55(44)3621-2830. (laverde@unipar.br)

têm aumentado o interesse pelo uso de moluscicidas de origem vegetal (McCULLOUGH et al., 1980). O interesse pelo uso destes compostos no controle da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto africano, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Seus frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933). No Brasil, os primeiros estudos sobre moluscicidas de origem vegetal demonstraram a atividade de extratos aquosos de caules de *Serjania* spp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) em *Biomphalaria glabrata*. Essa ação foi atribuída às saponinas presentes nestes vegetais (PINTO; ALMEIDA, 1944). Centenas de espécies vegetais medicinais, tóxicas e ornamentais já foram testadas quanto à sua atividade moluscicida. No Brasil, várias plantas foram testadas com a finalidade de verificar sua ação moluscicida (AMORIN; PESSOA, 1962; KLOOS; McCULLOUGH, 1982; MENDES et al., 1984; MENDES et al., 1999; ROUQUAYROL et al., 1972; SILVA et al., 1971).

Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial atividade moluscicida, várias espécies vegetais regionais devem ser testadas. Indica-se a utilização de extratos de folhas, galhos ou frutos de espécies de plantas regionais como matéria prima para obtenção de substâncias a serem empregadas no controle de *B. glabrata*. Nesta nota apresentamos detalhadamente o protocolo adaptado de Leyton et al. (2005), o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Experimentação em Animais (CEPEEA) da UNIPAR e aprovado pelo mesmo (protocolo 1009/2008).

Material e Métodos

Preparação dos extratos vegetais

As espécies vegetais coletadas são secas em estufas (40°C) com circulação de ar e, posteriormente, moídas ou trituradas, e submetidas à maceração com álcool etílico previamente destilado. Os extratos alcoólicos brutos obtidos são filtrados e evaporados em rotaevaporador, sob pressão reduzida e temperatura não superior a 50°C, até a remoção completa do etanol. Extratos de polaridades crescentes podem ser obtidos com extratores Soxhlet. O material seco e moído é submetido a extrações sequenciais com os seguintes solventes, seguindo a ordem de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol (HOSTETTMANN, QUEIROZ, VIEIRA, 2003).

Adaptação dos caramujos

Os caramujos utilizados nos testes de atividade moluscicida são espécimes de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Os caramujos devem ser adaptados à temperatura de 23-25°C e regime de iluminação natural, em caixa d'água de polietileno (95 cm de diâmetro x 55 cm de altura) com cerca de 200 litros de água, inicialmente neutralizada com calcário e mantida em repouso por um período mínimo de 24 horas, para a eliminação do cloro. O reservatório deve ser arejado por meio de bombas de ar (HOBBY14 – BIKI IND. E COM. LTDA - Brasil) (1,5W) e a temperatura da água é controla-

da com termostato eletrônico (Máster – Termostato – IND. DE EQUIP. PARA PSICULTURA – Brasil) (500W, 25 °C). Alguns exemplares de peixes lebitest da espécie *Poecilia reticulata*, além de ramos da planta aquática *Elodia canadensis*, também foram adaptados às condições do reservatório, compondo o ambiente do aquário. O alimento fornecido *ad libitum* constituiu-se de alface fresca (*Lactuca sativa*) para os caramujos e ração específica (ALEON GUPPY® MEP 200 COMPLEX – Brasil) para os peixes.

Ensaio moluscicidas

A verificação da atividade moluscicida em espécimes adultos de *B. glabrata* segue os procedimentos recomendados pela Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 1965 e 1983). Dois grupos de cinco moluscos, selecionados ao acaso e medindo entre 10 e 15 mm de diâmetro, são transferidos para miniaquários preenchidos com as soluções a serem testadas e cobertos com tampas perfuradas, para garantir a respiração dos caramujos. Cada caramujo ocupa um volume de 50 mL de solução do extrato testado. As amostras são diluídas em água do próprio reservatório, sem cloro, com o auxílio de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações iniciais de 400 e 100 ppm, para seleção dos extratos com potencial moluscicida. Após um período de exposição de 24 horas, os animais são retirados, lavados com água e transferidos para copos de plástico contendo água do aquário, onde permanecerão por um período de recuperação de mais 24 horas, quando a mortalidade for registrada. Em todos os ensaios são introduzidos grupos controle utilizando água e soluções de dimetilsulfóxido (DMSO) de concentração igual às usadas nos testes. São realizados ensaios com a substância comercial niclosamida (Atenase®-500mg Uci-farma) como moluscicida de referência (20 ppm). Como critério de morte, deve ser adotado a retração dos caramujos para dentro de suas conchas ou a liberação de hemolinfa. Além disso, são observados os batimentos cardíacos por meio de microscópio estereoscópico, para verificar a mortalidade dos moluscos. Segundo Hostettmann et al. (1980), os extratos são considerados bioativos quando CL_{90} (concentração letal a 90% da população estudada) for inferior a 400 ppm, porém, segundo a OMS, a atividade é considerada significativa quando CL_{90} for inferior a 100 ppm (WHO, 1965 e 1983). Logo, os extratos que provocarem 100% de mortalidade a 100 ppm são selecionados para a obtenção da CL_{90} . Testes adicionais são então realizados em concentrações inferiores (100; 75; 50; 25; 10; 5,0; 2,0 e 1,0 ppm), para a determinação dos valores de CL_{50} e CL_{90} através de tratamento estatístico dos dados de letalidade. Durante todo o ensaio moluscicida, os moluscos são alimentados com alface. Os extratos que apresentarem atividade bastante pronunciada ($CL_{50} < 30$ ppm) também serão testados para desovas de *Biomphalaria glabrata* e peixes da espécie *Poecilia reticulata*.

Destino dos animais pós-experimento

Embora os caramujos usados no experimento não devam estar infectados pelo parasito *Schistosoma mansoni*, se os mesmos forem lançados vivos no ambiente, poderiam se infectar e tornarem-se vetores deste parasito. Assim, após 48 horas de experimentação e avaliação da letalidade, todos

os caramujos, vivos ou mortos, devem ser expostos diretamente à solução concentrada de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) para completa letalidade. Os caramujos mortos devem ser congelados e, posteriormente, incinerados e descartados em aterro sanitário. Como todas as soluções dos extratos, controles positivo e negativo são preparadas com água do aquário e considerando que, ao coletar a água do aquário, eventualmente podem ser coletados também ovos dos caramujos, todas as soluções, inclusive a água de lavagem das vidrarias e objetos usados na preparação dos experimentos, tudo enfim, é desinfetado com solução concentrada de hipoclorito de sódio, antes de ser descartado em esgotos domésticos.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Universidade Paranaense (UNIPAR), pelo apoio financeiro recebido e à Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e da Pós-Graduação (DEGPP), pelo incentivo aos programas de iniciação científica (PIC e PIBIC) e de pesquisa docente (PIBIPP). À profa. Dra. Maria Lucília M. Zamuner (UEM) por gentilmente ceder exemplares de *Biomphalaria glabrata*, *Poecilia reticulata* e *Elodia canadensis*. À direção do Hospital Veterinário da UNIPAR, em especial ao Prof. Ms. Adrien Wilhelm Dilger Sanches, responsável pelo Laboratório de Diagnóstico Anatomopatológico, por cederem o espaço físico para a instalação do reservatório para a criação dos caramujos.

Referências

AMORIN, J. P.; PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscicida. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 14, p. 254-260, 1962.

ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 207-210, 1933.

CARVALHO, O. S. et al. Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO**, 12., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Inpe, 2005. p. 2083-2085.

HOSTETTMANN, K.; KIZU, H.; TOMIMORI, T. Molluscicidal properties of various saponins. **Planta Medica**, v. 44, p. 34-35, 1982.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003, 152 p.

KLOOS, H.; McCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. **Planta Medica**, v. 46, p. 195-209, 1982.

LEYTON, V. et al. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia, Sér. Zool.** Porto Alegre, v. 95, n.

2, p. 213-216, 2005.

McCULLOUGH, F. S. et al. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 681-689, 1980.

MENDES, N. M. et al. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 411-412, 1999.

MENDES, N. M. et al. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 348-354, 1984.

PINTO, C.; ALMEIDA, A. F. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 40, p. 291-311, 1944.

ROUQUAYROL, M. Z.; SOUZA, M. P.; SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro (III). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 53, n. 5, p. 215-220, 1972.

SILVA, M. J. M.; SOUZA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro II. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 52, n. 3, p. 117-123, 1971.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Memoranda - molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

World Health Organization, Reports Of The Scientific Working Group On Plant Molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 927-929, 1983.

Recebido em: 04/06/2008

Aceito em: 09/12/2008