

ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAÇÃO EM DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE *Plectranthus grandis* SOBRE *Biomphalaria glabrata*

José Augusto Albuquerque dos Santos¹

Keyla Nunes Farias Gomes²

Leonardo da Silva Rangel³

Robson Xavier Faria⁴

Saúde, Ambiente e Sociedade

Resumo

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*. Considerada a segunda doença parasitária mais importante em termos de saúde pública, estando atrás somente da malária. O Objetivo deste trabalho foi testar a atividade tóxica da fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas *Plectranthus grandis* sobre moluscos e embriões de *Biomphalaria glabrata* e verificar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀). A obtenção da fração foi realizada através do extrato bruto em etanol em Extrator Soxhlet. Após esta etapa, foi feita uma cromatografia por filtração Flash utilizando solventes apolares e polares para o fracionamento deste extrato. Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços. Na avaliação moluscicida com a fração em diclorometano, foi possível observar a taxa de mortalidade de 100% na concentração de 300 mg/L em 48 horas. No ensaio de atividade ovicida, foi possível obter 97,14% de mortalidade em 24 horas dos embriões de *B. glabrata*. Pode-se observar que a fração apresentou atividade moluscicida sobre os moluscos de *Biomphalaria glabrata* e inibiu o desenvolvimento de seus embriões. Foi possível calcular as concentrações letais da fração e pode-se observar que seu valor não está de acordo com o preconizado pela OMS, então se sugere a busca por novas alternativas farmacológicas e farmacotécnicas com a finalidade de diminuir esta concentração e estar no valor recomendado pela OMS.

Palavras-chave: Toxicidade; Esquistossomose; Molusco; Embrião; Produtos naturais

¹ Prof. Dr. Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), Santosjaa@gmail.com.

² Aluna do Curso de mestrado em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, kfarias1618@gmail.com

³ Aluno do curso de doutorado em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, leonardorangel.farmacia@gmail.com

⁴ Prof. Dr. Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses (LabTOXO), robson.xavier@gmail.com

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*. Considerada a segunda doença parasitária mais importante em termos de saúde pública, estando atrás somente da malária (Rocha *et al*, 2016).

A esquistossomose afeta mais de 200 milhões de pessoas e é encontrada em 54 países, sendo uma das parasitoses mais disseminadas no mundo. Esta doença parasitária é endêmica nas regiões da África, Ásia e toda a América do norte e sul, sendo o Brasil o país mais afetado das Américas (Rodrigues *et al*, 2013).

A Niclosamida é a única substância recomendada para combater os caramujos vetores da doença de esquistossomose. Entretanto, a mesma tem gerado preocupação devido a sua toxicidade em animais não alvos, a baixa seletividade, a resistência e defesa dos hospedeiros intermediários da espécie *Biomphalaria glabrata* e a contaminação no meio ambiente (Costa, 2015).

Há inúmeros relatos do uso de produtos naturais na busca por novos compostos que possam ser utilizadas no combate a doenças, principalmente, as negligenciadas. Em 1930, iniciaram-se pesquisas com a função de encontrar plantas com atividades moluscidas para controlar o hospedeiro intermediário da doença de esquistossomose (Mozley, 1939).

A espécie *Plectranthus grandis*, provavelmente originária da África e cultivada em todo o Brasil. Conhecida popularmente como boldo-do-Brasil, ela é utilizada tanto na medicina popular como na forma de fitoterápicos, pelas propriedades analgésicas e anti-dispéptica. Entre os estudos químicos, merecem destaques a composição química das folhas da planta que apresentam estrutura química de três diterpenos isolados: o barbatusin, presente em maior quantidade, o 3 β hydroxy-3-deoxybarbatusin e o ciclobutatusin, em menor quantidade (Costa, 2006).

O Objetivo deste trabalho foi testar a atividade tóxica da fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas *Plectranthus grandis* sobre moluscos e embriões de *Biomphalaria glabrata* e verificar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀).

METODOLOGIA

As folhas de *Plectranthus grandis* foram secas e pulverizadas em liquidificador e acondicionadas em recipiente apropriado. A obtenção da fração foi realizada através do

extrato bruto em etanol em Extrator Soxhlet, após a concentração em Evaporador rotativo, deixou-se evaporar até peso constante na capela de exaustão químico, obtendo-se a massa do extrato etanólico. Após esta etapa, foi feito uma filtração Flash utilizando solventes apolares e polares para o fracionamento deste extrato. O ensaio de bioatividade sobre os moluscos foi realizado segundo a metodologia descrita por World Health Organization, 1965 e adaptada por Santos *et al*, 2017. Os moluscos foram selecionados conforme o diâmetro de sua concha, entre 10 - 12 mm. Na montagem dos experimentos foram utilizadas placas de 24 poços em que dentro foram pipetadas uma quantidade de solução com a fração para um volume de 2 ml por poço, nas concentrações 50, 100, 150, 200 e 300 mg/L. Na avaliação, os animais foram alocados individualmente em placas e observado a letalidade por um período de 24 horas e 48 horas. O número de animais utilizados por teste foi de 24 moluscos. Os experimentos foram realizados com três repetições. Nos bioensaios, a mortalidade foi possível ser observada através da retração da parte mole dos caramujos para dentro de suas conchas, odores de putrefação e/ou a liberação de hemolinfa na solução.

O ensaio de atividade ovicida foi realizado com cápsulas ovíferas coletadas em placas de isopor, colocadas no tanque de criação de *B. glabrata* situado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Após a coleta foram selecionadas as cápsulas ovíferas com embriões em estágio avançado de desenvolvimento através de um estereomicroscópio, estes embriões foram selecionados de acordo com a quantidade (N = 35) e foram transferidos para uma placa de 24 poços contendo a fração em diclorometano das folhas de *P. grandis* na concentração de 100 mg/L. Foram utilizados os mesmos controles positivo e negativo do ensaio de bioatividade sobre moluscos. As cápsulas ovíferas foram examinadas em um período de 24 horas e 48 horas após o início do experimento sob um estereomicroscópio. A morte dos embriões foi possível determinar através da observação de forma desintegrada dos embriões no interior do ovo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de atividade moluscicida com a fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Plectranthus grandis*, foi possível observar a taxa de mortalidade

de 89% na concentração de 200 mg/L e a partir da concentração de 300 mg/L pode-se notar 100 % de mortes. Após o período de 48 horas do bioensaio, foi possível calcular as concentrações letais 50 e 90, sendo elas $CL_{50} = 134,71$ mg/L e $CL_{90} = 239,97$ mg/L.

No ensaio da atividade ovicida com a fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Plectranthus grandis*, foi possível observar que a taxa de mortalidade dos embriões de *Biomphalaria glabrata* foi igual a 97,14% em 24 horas. Ao observar o controle negativo, pode-se notar que houve uma mortalidade muito pequena ao comparar com o controle positivo, a Niclosamida obteve 98,08% de mortalidade destes embriões. Foi possível correlacionar a fração em diclorometano com o controle positivo, pode-se observar que a taxa de mortalidade da fração está próxima da substância sintética, ou seja, a fração em diclorometano inibiu o desenvolvimento dos embriões de *Biomphalaria glabrata*.

A Organização Mundial da Saúde (1983) determina que a espécie de origem vegetal apresente atividade moluscicida de 90% da população (CL_{90}) em concentração de 100 mg/L. A fração em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Plectranthus grandis* não se apresentou dentro do valor recomendado, porém, poderiam ser utilizadas alternativas farmacológicas e farmacotécnicas em possíveis estudos futuros na possibilidade de diminuir as concentrações letais.

A espécie *Plectranthus grandis*, é muito utilizada na medicina popular, devido às propriedades antidiarréica, analgésicas e estimulantes da digestão. Esta espécie possui diversas classes de compostos, porém os terpenos (Mono e sesquiterpenos) e os fenilpropenos são as classes mais encontradas (Bandeira *et al*, 2011).

A Niclosamida, um produto moluscicida sintético utilizado no combate aos moluscos vetores da esquistossomose, possui diversos problemas já relatados, sendo um deles a sua elevada toxicidade ambiental. Devido a isso, a necessidade de novas buscas por substâncias com ação moluscicida originados de produtos naturais. Segundo Cantanhede e colaboradores (2010), realizaram uma revisão sobre o tema moluscicida derivado de plantas e mostrou que muitas espécies vegetais foram testadas para este fim, mas poucas foram estudadas mais a fundo, quanto à atividade de seus metabólitos secundários e princípios ativos.

CONCLUSÕES

Pode-se observar que a fração das folhas de *Plectranthus grandis* apresentou atividade moluscicida sobre os moluscos de *Biomphalaria glabrata* ($CL_{50} = 134,71$ mg/L e $CL_{90} = 239,97$ mg/L) e pode-se observar que seu valor não está de acordo com o preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), entretanto, 100 mg/L da fração em diclorometano inibiu o desenvolvimento de embriões de *Biomphalaria glabrata* em 97%, sendo uma alternativa no controle populacional do molusco. Assim, sugerimos a busca por novas alternativas farmacológicas e farmacotécnicas com a finalidade de diminuir estas concentrações moluscicidas a níveis recomendados pela OMS.

REFERÊNCIAS

- Bandeira, J. M.; Barbosa L. M. P.; Rodrigues I. C. S.; Bacarin, M. A.; Peters, J. A.; Braga, E. J. B. **Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus***. Ver. Bras. Pl. Med., Botucatu, V. 12, n. 2, p. 157 – 164, 2011.
- Cantanhede, S. P. D.; Marques, A. M.; Silva-Souza, N; Valverde, A. L. **Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática**. Rev. bras. farmacogn. Apr./May 2010; vol.20 n.º 2 Curitiba
- Costa, A.V.; Almeida, B. R.; Gonçalves, L.V.; Crico, K. B.; Ignacchiti, M. D. C.; Pereira Junior, O. S.; Pinheiro, P. F.; Queiroz, V. T. **Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) sobre *Lymnaea columela* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835)**. Revista de Plantas Mediciniais. 2015; 17(4), 707-712
- Costa, M. C. C. D. 2006. **Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.2, p.81-88.
- Mozley, A. **Freshwater mollusca of the Tanganyika Territory and the Zanzibar Protectorate, and their relation to human schistosomiasis**. Trans R Soc Edinburgh. 1939; 59: 687-730.
- Rocha, T. J. M.; Santos, M. C. S.; Lima, M. V. M.; Colheiros, C. M. L.; Wanderley, F. S. **Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil**. Revista Pan-Amazônica de saúde. 2016; 7(2): 27-32.
- Rodrigues, K. A. F.; Dias, C. N.; Amaral, F. M. M.; Moraes, D. F. C.; Filho VEM.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S. **Molluscicidal and larvicidal activities and essencial oil composition of *Cymbopogon winterianus***. Pharmaceutical Biology. 2013; 51(10): 1293 – 1297.
- Santos, J. A. A, Cavalcante, V. P, Rangel, L. S.; Leite, J. C. V. A.; Faria, R. X. 2017. **A new technique using low volumes: A new technique to assess the molluscicidal activity using low volumes**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.; 2017:10p.
- World Health Organization, 1965. **Molluscicide Screening and Evolution Bull**. The World Health. Org. vol. 33 n.4, 1965.
- World Health Organization. **Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides**. Geneva: TDR/SC 4-SWE 1983; (4)/83.3.