

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO LÁTEX DE *SYNADENIUM CARINATUM* BOISS.
(*EUPHORBIACEAE*) SOBRE *BIOMPHALARIA GLABRATA* E ISOLAMENTO DO
CONSTITUINTE MAJORITÁRIO**

***MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF SYNADENIUM CARINATUM BOISS.
(EUPHORBIACEAE) LATEX AGAINST BIOMPHALARIA GLABRATA AND ISOLATION
OF MAJOR COMPOUND***

**Carolina Paula de Souza Moreira^{1*}; Carlos Leomar Zani²; Tânia Maria de Almeida
Alves³**

¹ Farmacêutica. Mestre em Ciências da Saúde. Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ e Serviço de Bioprospecção Farmacêutica, Fundação Ezequiel Dias.

² Farmacêutico. Doutor em Química Orgânica. Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

³ Farmacêutica. Doutora em Química Orgânica. Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002, Belo Horizonte-MG. Telefone: (31) 3349-7791

* E-mail do autor para correspondência: carolina@cpqrr.fiocruz.br

Recebido em 28/08/2009, Aceito em 13/07/2010

RESUMO: A esquistossomose é a segunda doença parasitária mais importante no mundo, atingindo mais de 220 milhões de pessoas. A *Biomphalaria glabrata* é a principal espécie que atua como hospedeira intermediária do *Schistosoma* no Brasil, sendo o controle dos caramujos uma medida profilática de sucesso empregada no combate à doença. A busca de moluscicidas derivados de plantas tem sido intensificada como alternativa ao uso de moluscicidas sintéticos. O extrato metanólico do látex da *Synadenium carinatum* apresentou atividade moluscicida na concentração de 0,5 µg/L (CL_{100/24h} = 0,5 ppm) e seu constituinte majoritário foi isolado e identificado como sendo o triterpeno tetracíclico eufol.

Palavras-chave: esquistossomose, *Biomphalaria glabrata*, látex, euphol.

ABSTRACT: Schistosomiasis is the second most important parasitic disease worldwide, affecting over 220 million people. *Biomphalaria glabrata* is the main species that acts as intermediate host of *Schistosoma* in Brazil, and the control of snails is a prophylactic measure successfully used against the disease. The search for molluscicide derived from plants has been intensified as an alternative to the use of synthetic molluscicide. The methanol extract of *Synadenium carinatum* latex showed molluscicidal activity on the concentration of 0.5 µg/L ($LC_{100/24h} = 0.5$ ppm) and its major constituent was isolated and identified as the tetracyclic triterpene euphol.

Keywords: schistosomiasis, *Biomphalaria glabrata*, latex, euphol.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em países da África, América do Sul, Caribe e Ásia (Figura 1). Mais de 220 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, 779 milhões estão em risco de serem infectadas em países onde a doença é endêmica e estima-se que ocorram 500 mil mortes por ano em

decorrência da doença. Em termos de prevalência, saúde pública e importância socioeconômica, a esquistossomose é a segunda doença parasitária mais importante, perdendo apenas para a malária. Com o aumento das migrações e do turismo, o número de casos em países onde a doença não é endêmica vem aumentando.¹⁻³

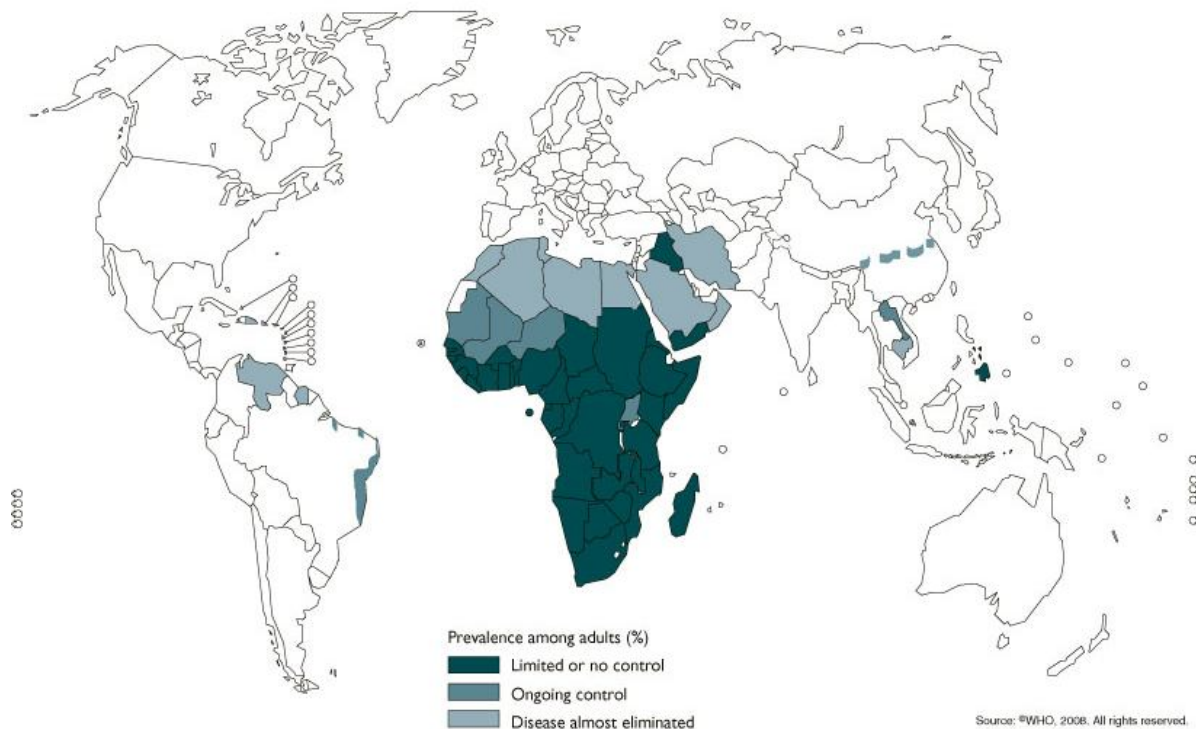


Figura 1. Distribuição mundial da esquistossomose em 2007.⁴

Várias espécies do gênero *Schistosoma* (*S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*) podem causar a doença em humanos, mas é a espécie *S. mansoni* a principal responsável pela esquistossomose.¹⁻³ O ciclo de vida do helminto envolve dois hospedeiros: um hospedeiro intermediário invertebrado (um caramujo do gênero *Biomphalaria*) e um hospedeiro final (homem).

Em humanos, a natureza da doença é imunológica, relacionando-se indiretamente com o parasito. A patologia é causada pela resposta inflamatória decorrente da presença de ovos do parasito que são retidos nos tecidos do hospedeiro, especialmente nas veias mesentéricas.³

O controle da esquistossomose exige a combinação de três frentes: o tratamento quimioterápico dos doentes, o controle dos hospedeiros intermediários (caramujos) e práticas de educação em saúde (melhoria das condições de higiene).²

A doença é tratada com o emprego de praziquantel, único fármaco disponível no mercado. A disponibilidade de um único medicamento mostra a importância de se buscar novas substâncias que possam eliminar o agente etiológico.

Outra forma de controlar a doença é eliminar o hospedeiro intermediário e interromper o ciclo do helminto, evitando que novas pessoas sejam contaminadas. Essa estratégia requer criterioso cuidado

com o meio ambiente. Moluscidas sintéticos, como a niclosamida – droga moluscida recomendada pela Organização Mundial da Saúde (Figura 2) –, têm sido utilizados extensivamente durante anos em programas de controle da esquistossomose.⁵ Entretanto, o elevado custo desses agentes para os países onde a doença é endêmica, além

da complexidade de aplicação e toxicidade para outros organismos (incluindo o homem), são fatores que contribuem para o aumento do interesse na busca de moluscidas naturais. Espera-se que estes sejam mais baratos, menos tóxicos para o ambiente e mais rapidamente disponíveis.¹⁻²

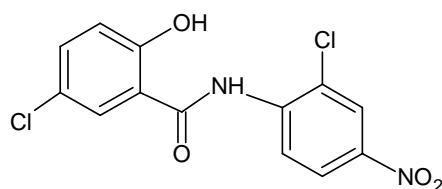


Figura 2. Estrutura da niclosamida.

O número e a variedade de plantas com potencial ação moluscida são grandes. Entre as espécies ativas destacam-se as da família *Euphorbiaceae*. Vasconcellos e Schall⁶ descreveram a atividade moluscida do látex da *Euphorbia milii* Des Moul., uma planta ornamental amplamente disseminada no país e conhecida como coroa-de-cristo. O estudo químico desta espécie forneceu o mais potente produto natural moluscida, a miliamina L, cuja concentração letal para 100% dos caramujos (CL₁₀₀) foi de 2,5 µg/L (4 nM).⁷

A espécie *Synadenium carinatum*, cujo látex apresentou atividade moluscida para *Biomphalaria glabrata* é uma espécie da família *Euphorbiaceae*, sendo muito utilizada no Brasil como planta ornamental e seu látex consumido pela população para o tratamento de várias doenças, entre elas o câncer.⁸ Apesar do uso popular das espécies do

gênero *Synadenium*, pouco se conhece sobre sua química e atividade biológica. Da espécie *S. carinatum* foi isolada uma D-galactose lectina que mostrou um potente efeito aglutinador de eritrócitos humanos, potencial para ser utilizada como adjuvante na imunização de camundongos BALB/C com promastigostas de *Leishmania amazonensis* e, também, efeito imunomodulador em inflamações alérgicas.⁸⁻¹⁰

Na busca por substâncias de origem natural para utilização no controle dos hospedeiros intermediários no ciclo da esquistossomose reporta-se neste trabalho a atividade moluscida do látex de *S. carinatum* (*Euphorbiaceae*), bem como seu fracionamento biomonitorado visando o isolamento de substâncias moluscidas.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Extração

Papéis de filtro embebidos do látex do caule, pecíolos e folhas frescas foram colocados em um frasco de vidro e extraídos durante sete dias com metanol (ME) a 4°C. Depois desse período, os papéis de filtro foram retirados e lavados três vezes com o solvente. O mesmo procedimento foi realizado apenas com o papel de filtro e ME para verificar possíveis interferências deste nos resultados dos ensaios biológicos.

2 Prospecção fitoquímica

Foi preparada uma solução metanólica do extrato a 1 mg/mL. Foram utilizadas placas de sílica gel com indicador de fluorescência (Merck® F₂₅₄) para detecção das classes de produtos naturais. Após aplicação da amostra, as placas foram eluídas em cuba de vidro com acetato de etila/metanol/água (100:13,5:10) e tolueno: acetato de etila (93:7), e reveladas com vanilina/H₂SO₄, dragendorff, KOH, NP/PEG e sulfato cérico.¹¹

3 Fracionamento por cromatografia em contracorrente

Uma amostra de 700 mg do extrato do látex foi fracionada em cromatógrafo modelo HSCCC-1000 Pharma-Tech Research Corp. Foi utilizada a fase inferior da mistura bifásica hexano/etanol/água (6:5:1) como fase estacionária. A fase móvel foi injetada na direção cauda-cabeça e as frações foram recolhidas a cada 5 minutos. As frações obtidas foram

analisadas por cromatografia em camada delgada para agrupamento.

4 Isolamento do constituinte majoritário

O grupo majoritário C obtido por HSCCC foi refractionado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando cromatógrafo Shimadzu LC6AD, coluna Shim-Pak ODS (20 x 250 mm), fluxo de 10 mL/min, ME/água (7:3) como eluente e detecção em λ_{210} nm.

O pó branco obtido na fração C foi recristalizado em etanol/água (2:1). Foram feitos os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C (Brucker, 400 MHz) da amostra recristalizada.

5 Avaliação da atividade moluscicida

Foram utilizados caramujos da espécie *B. glabrata* com diâmetro de 11-14 mm, criados no moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou.

Alíquotas de 10 mg do extrato e das frações foram colocadas em frascos de vidro com capacidade de 100 mL, previamente lavados com sabão de coco. Os solventes utilizados na transferência das amostras foram removidos a vácuo e em seguida adicionados 100 mL de água desclorada a cada frasco, fornecendo uma solução de 100 mg/L (100 ppm). Quatro caramujos foram colocados nos frasco e mantidos submersos na solução por uma tela de gaze. Os controles foram: (a) água desclorada; (b) resíduos

após evaporação do solvente utilizado; (c) niclosamida (3 ppm). Após 24 h os frascos foram abertos e verificou-se a morte dos caramujos por hemorragia, a olho nu, ou por parada dos batimentos cardíacos, com auxílio de lupa.

No caso de 100% de morte, novos testes foram realizados com concentrações inferiores a 100 ppm, até a determinação da mínima concentração capaz de provocar morte em 100% dos caramujos ($CL_{100\%/24h}$) (Tabela 1). Para o monitoramento do fracionamento foi utilizada a concentração de 1 ppm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por cromatografia em camada delgada do extrato do látex em metanol, utilizando reveladores específicos, indicou a presença de terpenoides e cumarinas nesse extrato.

A determinação da atividade moluscicida foi feita empregando o protocolo de toxicidade aguda da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Segundo a OMS, os ensaios com extratos vegetais devem começar utilizando-se soluções a 100 ppm.¹² Esse valor empírico sugere um limite para que os efeitos tóxicos causados pelo extrato sejam os menores possíveis. Quanto menor a concentração na dose letal (100% de morte dos caramujos), melhores são as condições de uso do extrato no meio ambiente, já que o impacto causado por este é reduzido e uma menor quantidade de material é consumida.

O extrato metanólico do látex presente nas partes superiores do vegetal, na concentração de 0,5 mg/L (0,5 ppm), levou à morte, em 24 h, de 100% dos caramujos por hemorragia (Tabela 1). A alta toxicidade do extrato metanólico do látex de *S. carinatum* revelou-se um fator importante para a análise do metabolismo secundário da espécie, buscando-se o(s) componente(s) ativo(s).

Tabela 1 – Determinação da mínima concentração do extrato do látex de *Synadenium carinatum* com capacidade de causar a morte de 100% dos caramujos

Amostra	Concentração (ppm)	% de morte (24 h)	Observação
Látex em ME*	100	100	Hemorragia
Látex em ME	50	100	Hemorragia
Látex em ME	25	100	Hemorragia
Látex em ME	10	100	Hemorragia
Látex em ME	5	100	Hemorragia
Látex em ME	0,5	100	Hemorragia

Látex em ME	0,05	0	-
Água desclorada	-	0	-
Resíduo de solvente	-	0	-
Niclosamida	3	100	Hemorragia

* ME = Metanol.

A cromatografia em contracorrente foi utilizada para o fracionamento do extrato. Foram recolhidas 84 frações, as 55 primeiras tendo como solvente a fase superior, rica em hexano, e as 29 últimas tendo como solvente a fase inferior, rica em água. Todas as frações

foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e, posteriormente, agrupadas em 12 grupos (A -L), os quais foram submetidos ao ensaio moluscicida (Tabela. 2).

Tabela 2 – Atividade das frações obtidas por cromatografia em contracorrente sobre *Biomphalaria. glabrata*

Amostra*	% de morte (24 h)	Observação
Látex em ME**	100	Hemorragia
Grupo A	0	-
Grupo B	0	-
Grupo C	0	-
Grupo D	0	-
Grupo E	0	-
Grupo F	0	-
Grupo G	0	-
Grupo H	0	-
Grupo I	100	Hemorragia
Grupo J	100	Hemorragia
Grupo K	0	-
Grupo L	0	-
Água desclorada	0	-
Resíduo de solvente	0	-
Niclosamida***	100	Hemorragia

* 1 mg/L.

*** 3mg/L

** ME = metanol.

Pela análise do perfil cromatográfico e avaliação da atividade moluscicida dos grupos, foi possível determinar a localização das substâncias ativas no extrato (grupos I e J). Tratam-se de substâncias polares que ficaram retidas pela fase estacionária (fase hidrofílica). Esses grupos representaram apenas 1,22% da massa injetada do extrato, sugerindo que essas substâncias são minoritárias na constituição da amostra. A obtenção de maior quantidade desses grupos é necessária para viabilizar o isolamento e identificação das substâncias ativas.

O grupo C, embora não tenha apresentado atividade moluscicida, foi o que obteve maior rendimento em massa e, após evaporação do solvente, observou-se a formação de um sólido branco, constituinte majoritário do extrato. A análise por CCD indicou que a substância era um terpenoide. Após cristalização em etanol/água (2:1) foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e os dados comparados com aqueles da literatura. A análise dos espectros mostrou que a substância possuía 30 átomos de carbono, 8 grupos metila e 1

hidroxila, sugerindo ser um triterpeno. A comparação com dados da literatura revelou que um triterpeno tetracíclico, isolado de *Euphorbia broteri*,¹³ mostrava as mesmas características do triterpeno isolado (Tabelas 3 e 4).

Pela análise e comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C com aqueles descritos na literatura, foi possível concluir que a substância isolada era o eufol, um triterpeno tetracíclico (Figura 3). O ponto de fusão foi determinado como 117°C, mostrando-se muito semelhante à faixa de 115-116°C determinada por Teresa e colaboradores.¹³ O eufol é uma substância quiral e, portanto, apresenta atividade óptica. Para se comprovar que a substância é o eufol e não um enantiômero é preciso determinar o poder de rotação específica ($[\alpha]_D$) e comparar com o valor descrito na literatura. O eufol é uma substância comum na família *Euphorbiaceae*, entretanto, o seu isolamento está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Synadenium*.

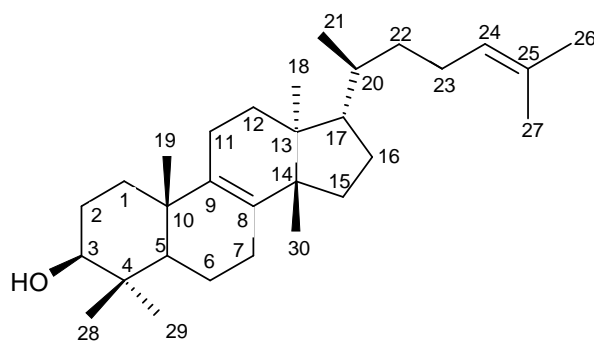


Figura 3. Estrutura do eufol.

Tabela 3 – Deslocamentos químicos de hidrogênio (CDCl₃, 400 MHz) observados para o composto isolado do látex de *Synadenium carinatum* em comparação com dados da literatura (CDCl₃, 200 MHz)

Hidrogênio	Literatura ⁽¹³⁾ (200 MHz)		Experimental (400 MHz)	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	3,20 <i>m</i>	15,7	3,24 <i>dd</i>	4,4 e 11,6
H-18	0,69 <i>s</i>	-	0,76 <i>s</i>	-
H-19	1,00 <i>s</i>	-	1,00 <i>s</i>	-
H-21	0,91 <i>d</i>	6,1	0,92 <i>d</i>	6,3
H-24	5,11 <i>t</i>	6,3	5,10 <i>m</i>	6,9
H-26	1,60 <i>s</i>	-	1,61 <i>s</i>	-
H-27	1,68 <i>s</i>	-	1,69 <i>s</i>	-
H-28	0,88 <i>s</i>	-	0,87 <i>s</i>	-
H-29	0,98 <i>s</i>	-	0,96 <i>s</i>	-
H-30	0,81 <i>s</i>	-	0,81 <i>s</i>	-

Tabela 4 – Deslocamentos químicos de carbono (CDCl₃, 100 MHz) observados para o composto isolado do látex de *Synadenium carinatum* em comparação com dados da literatura (CDCl₃, 50 MHz)

Carbono	Tipo	Literatura ⁽¹³⁾ (50 MHz)	Experimental (100 MHz)
1	CH ₂	35,70	35,29
2	CH ₂	26,60	27,69
3	CH	79,08	79,03
4	C	38,96	38,96
5	CH	50,54	50,99 ou 50,15
6	CH ₂	18,37	18,97
7	CH ₂	27,94	27,70
8	C	134,57	134,11 ou 133,58
9	C	134,57	134,11 ou 133,58
10	C	36,33	37,30
11	CH ₂	21,10	21,48
12	CH ₂	28,28	27,97
13	C	44,63	44,14
14	C	49,93	49,98
15	CH ₂	30,95	30,82
16	CH ₂	29,74	29,86
17	CH	50,54	50,99 ou 50,15
18	CH ₃	15,84	15,54
19	CH ₃	19,2	20,16
20	CH	36,33	36,35
21	CH ₃	18,72	18,71
22	CH ₂	35,70	35,29
23	CH ₂	25,03	24,96
24	CH	125,35	125,28
25	C	130,88	130,91
26	CH ₃	17,67	17,64
27	CH ₃	25,76	25,73
28	CH ₃	24,31	24,38
29	CH ₃	28,04	28,07
30	CH ₃	15,48	15,46

CONCLUSÃO

O estudo cromatográfico do extrato do látex de *Synadenium carinatum* Boiss, indicou a presença de cumarinas e terpenoides em sua constituição. A presença dessas classes de produtos naturais está de acordo com os resultados obtidos por Machado,¹⁴ que detectou no extrato hidroalcolico do látex de *S. carinatum* alcaloides, heterosídeos flavônicos, cumarinas e terpenoides, e no extrato aquoso taninos e heterosídeos antocianicos.

Quanto à atividade moluscicida o extrato apresentou concentração letal (CL₁₀₀/24 h) de 0,5 mg/L (0,5 ppm). Esse resultado mostra que a planta tem um forte potencial moluscicida.

O fracionamento biomonitorado do extrato por HSCCC mostrou que as substâncias ativas são polares e minoritárias em sua constituição, mas seu uso ainda depende de estudos que

comprovem a ausência de toxicidade para fauna e flora, bem como para o ser humano. É importante considerar que muitas espécies da família *Euphorbiaceae* são tóxicas e devem ser empregadas com cautela. Além disso, a toxicidade do látex para eritrócitos humanos, observada por Souza et al.⁸ ressalta a importância do isolamento das substâncias ativas para avaliação da toxicidade e posterior uso clínico.

O constituinte majoritário do extrato do látex foi isolado e identificado como sendo o eufol ou seu enantiômero, um triterpeno tetracíclico. Mesmo não sendo a substância com atividade moluscicida, é importante que seja feito o estudo fitoquímico dessa espécie, ainda mais considerando que pouco se sabe sobre a química do gênero *Synadenium* e que a atividade moluscicida é relatada pela primeira vez.

REFERÊNCIAS

SANTOS AF et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.*, 2007; 98:135-139.

ADENUSI AA, ODAIBO AB. Laboratory assessment of molluscicidal activity of crude aqueous and ethanolic extracts of *Dalbergia sissoo* plant parts against *Biomphalaria pfeifferi*. *Travel. Med. Infect. Dis.*, 2008; 6:219-227.

RIBEIRO KAL et al. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (*Diptera: Culicidae*), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*, 2009; 111(1):44-50.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Schistosomiasis 2007* [online]. Disponível em:
<<http://www.who.int/ith/maps/schisto2008.jpg>>. Acesso em: 10 jun. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico: Niclosamida.
Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/n07.pdf>>. Acesso
em: 15 jul. 2010.

VASCONCELLOS MC, SCHALL VT. Latex of “Coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens*): an
affective molluscicide. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 1986; 81(1):85-91.

ZANI CL et al Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milli* var. *hisloppi*. *Phytochemistry*,
1993; 34(1):89-95.

SOUZA MA. Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose-Binding Lectin from
the Latex of *Synadenium carinatum*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2005; 48(5):705-716.

AFONSO-CARDOSO SR et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on
Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. *Korean J. Parasitol.*, 2007; 45(4):255-
266.

ROGERIO AP et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from
Synadenium carinatum latex. *Glycobiology*, 2007; 17(8):795–804.

WAGNER H, BLADT S. *Plant Drug Analysis*. A thin layer chromatography atlas. Berlin:
Springer, 1996.

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.

TERESA JP. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*, 1987; 26(6):1767-1767.

MACHADO AA. Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium
carinatum* Boiss (*Euphorbiaceae*). 2008. 78 f. Tese (Mestrado)–Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.