



Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae)

A.L.T.G. Ruiz^{1,2*}, E.G. Magalhães¹, A.F. Magalhães¹, A.D. Faria³, M.C.E. Amaral³,
D.R. Serrano³, E.M. Zanotti-Magalhães³, L.A. Magalhães³.

¹Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, UNICAMP, C.P. 6154, 13084-971, Campinas, SP, Brasil

²Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, 13084-971, Campinas, SP, Brasil

³Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, 13084-971, Campinas, SP, Brasil

RESUMO: O gênero *Eleocharis* R. Br. compreende cerca de 200 espécies, ocorrendo em ambientes úmidos tais como brejos e margens de rios e lagos. Procurando novos agentes moluscicidas, os extratos de *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult., *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roem. & Schult., *Eleocharis maculosa* (Vahl) Roem. & Schult. e *Eleocharis sellowiana* Kunth foram testados para atividade moluscicida, contra caramujos adultos e desovas, e toxicidade (ensaio de letalidade com *Artemia salina*). O extrato hexânico de *Eleocharis acutangula* (parte subterrânea fresca) foi ativo contra *Artemia salina* (CL₅₀ = 476,00 µg/mL), enquanto os demais extratos apresentaram CL₅₀ >> 10³ µg/mL, sugerindo baixa toxicidade. O extrato hidro-etanólico de *Eleocharis sellowiana* (parte subterrânea fresca) foi ativo contra desovas de *Biomphalaria glabrata* (CL₅₀ = 24,27 µg/mL) mas inativo contra indivíduos adultos. Os demais extratos testados não apresentaram atividade moluscicida.

Unitermos: Cyperaceae, *Eleocharis*, atividade moluscicida, atividade ovicida, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

ABSTRACT: "Toxic evaluation of four species of the genus *Eleocharis* (Cyperaceae) in *Artemia salina* and *Biomphalaria glabrata*". The genus *Eleocharis* R. Br. comprises about 200 species, occurring in wet environments like swamps, lakes and river margins. In the search for new molluscicides, extracts from *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult., *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roem. & Schult., *Eleocharis maculosa* (Vahl) Roem. & Schult. and *Eleocharis sellowiana* Kunth were tested for molluscicidal activity (spawns and adult snails) and toxicity (Brine Shrimp Lethality - BSL - bioassay). The hexane extract of *Eleocharis acutangula* (fresh subterraneous parts) was active in the BSL bioassay (LC₅₀ = 476 µg/mL), while the other extracts showed LC₅₀ >> 10³ µg/mL, suggesting they have low toxicity. The aqueous ethanol extract of *Eleocharis sellowiana* (fresh subterraneous parts) was active against *Biomphalaria glabrata* spawns (LC₅₀ = 24.27 µg/mL) but it was not lethal to adult snails. No other plant extract tested in this study showed molluscicidal activity.

Keywords: Cyperaceae, *Eleocharis*, molluscicidal activity, ovicidal activity, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

Esquistossomose, causada pelo trematóide *Schistosoma mansoni*, é uma importante doença endêmica no Brasil e em muito outros países tropicais. O ciclo de vida desse parasita envolve um hospedeiro intermediário representado no Brasil por caramujos do gênero *Biomphalaria* (Alves et al., 2000), sendo o caramujo *B. glabrata* o principal vetor nas Américas do Sul e Central. De acordo com Paraense e Correa (1963), *B. glabrata* é considerado um agente transmissor modelo, provavelmente por causa de adaptações fisiológicas entre o molusco e a cepa local do parasita. Mais ainda,

experimentos realizados por Zanotti-Magalhães et al. (1997) com espécimes coletados em Belo Horizonte (MG) confirmaram o alto potencial como vetor atribuído a *B. glabrata*.

Para o controle da esquistossomose, além do tratamento dos pacientes infectados, é muito importante que as populações de caramujos sejam controladas como uma forma de redução do risco de transmissão da doença. A niclosamida é o moluscicida comercialmente disponível recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e provou ser mais efetivo e menos prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana do que outros moluscicidas inorgânicos ou sintéticos, porém o alto custo de sua

aplicação em áreas extensas torna proibitivo o seu uso na maioria dos países em desenvolvimento. Desta forma, a busca por moluscicidas naturais ganhou um novo destaque visando a obtenção de um produto alternativo mais barato, biodegradável, seguro e disponível localmente para controle das populações de caramujos (Clark et al., 1997; Oliveira-Filho; Paumgarten, 2000). Uma importante faceta da atividade de um eficiente moluscicida é sua capacidade de matar as desovas dos caramujos (Tang et al., 1995).

A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (Meyer et al., 1982; Nick et al., 1995), mas que também pode ser utilizado para expressar a toxicidade de um extrato com atividade moluscicida contra organismos não-alvos, como peixes e pequenos crustáceos (Oliveira-Filho; Paumgarten, 2000; Lima et al., 2002).

O gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae, Cyperoidae, Scirpeae) abrange cerca de 200 espécies, que ocorrem em ambientes úmidos como pântanos e margens de lagos e rios. A parte aérea compreende um caule simples não ramificado que termina em uma inflorescência formada por inúmeras flores, enquanto um caule modificado, denominado rizoma ou estolão (dependendo da forma) e as raízes formam a parte subterrânea. *E. sellowiana* Kunth ocorre no México, Colômbia, Paraguai e Brasil, enquanto *E. acutangula* (Roxb.) Schult. ocorre na Ásia, Austrália, África, Índia, Japão e Américas do Sul e Central. Ambas as espécies são amplamente distribuídas pelo estado de São Paulo. Já *E. maculosa* (Vahl) Roem. & Schult. e *E. interstincta* (Vahl) Roem. & Schult. ocorrem na Índia e Américas do Sul e Central e são encontradas em apenas algumas áreas do estado de São Paulo (Faria, 1998). Destas quatro espécies, apenas *E. sellowiana* e *E. acutangula* já foram objeto de estudos fitoquímicos, resultando no isolamento de lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol, uma mistura de campesterol, stigmasterol e sitosterol, neohopa-13(18)-eno-3 α -ol, estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol, ácido betulínico, estigmasta-4-eno-6 β -ol-3-ona, ferna-9(11)-eno-3 α -ol, 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 β -hopano-15,19-diona e hexadecanoato de *E*-fitila além de dezoito ésteres de ácidos graxos, sete alcanos de cadeia longa, diidroactinidiolídeo, fitona, neofitadieno, curcumeno, α -muuroloeno e γ -cadineno (Ruiz, 2003, Amaral et al., 2004).

Neste contexto, os extratos de algumas espécies de *Eleocharis* foram submetidos aos ensaios com larvas de *Artemia salina* e com caramujos e desovas de *B. glabrata*, visando novas alternativas para o controle da esquistossomose.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Amostras de todas as espécies foram coletadas na região de Campinas (SP, Brasil) e foram identificadas por A. D. Faria e M. C. E. Amaral. Exsiccata das espécies: *E. sellowiana*: A.D. Faria et al. 1000, UEC 103089; *E. acutangula*: A.D. Faria et al. 1001, UEC 103088; *E. interstincta*: L.Y.S. Aona, A.D. Faria & G.Jacobucci 95/12, UEC 94218; *E. maculosa*: L.Y.S. Aona, A.D. Faria et al. 97/213, UEC 93701, estão depositados no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Extração

Plantas recentemente coletadas foram separadas em partes aéreas e subterrâneas. Extratos de ambas as partes frescas foram obtidos por maceração com etanol (5 x 1L, 24h de maceração cada) e após redução do volume (cerca de 200 mL) e adição de água (200 mL), o extrato hidroetanólico bruto foi submetido a partição em funil de separação com hexano (4 x 200 mL), acetato de etila (4 x 200 mL) e CHCl₃ (4 x 200 mL) sendo que a fração hidroetanólica final também foi concentrada. Partes aéreas moídas e secas foram extraídas em aparelho Soxhlet com hexano, CH₂Cl₂ e MeOH (4L cada) e os extratos resultantes foram concentrados. As quantidades empregadas de material vegetal, bem como as quantidades obtidas de extrato encontram-se resumidas na Tabela 1.

Ensaio de letalidade com *Artemia salina*

O ensaio foi realizado segundo o procedimento descrito na literatura (Meyer et al., 1982; McLaughlin et al., 1995) e as concentrações letais abaixo de 10³ μ g/mL indicavam uma potencial atividade tóxica. Resumidamente, cada extrato (20 mg) foi dissolvido em 2 mL de solvente apropriado e dessa solução, amostras de 5, 50 e 500 μ L foram transferidas, em triplicata, para os frascos de 5 mL. Após a remoção total do solvente, uma solução salina (0,38 g/L, 5 mL) foi adicionada em cada um dos frascos, resultando em concentrações finais de 10, 100 e 1000 μ g/mL, respectivamente. Larvas do tipo nauplii de *A. salina* (10 por frasco) foram adicionadas e após 24 h de contato, os sobreviventes foram contados. Os dados foram analisados através do método de Probit (Finney, 1962) e expressos como CL₅₀ (Tabela 1).

Moluscos

Foram utilizados caramujos *B. glabrata* melanicos, com 10-15 mm de diâmetro, coletados de Belo Horizonte (MG) e mantidos em aquários com circulação contínua de água desclorada e à temperatura de 28 °C, no Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Unicamp.

Ensaio de atividade moluscicida contra indivíduos adultos

O ensaio foi realizado segundo o procedimento descrito na literatura (Magalhães et al., 2003) e as concentrações letais abaixo de 100 µg/mL indicavam uma potencial atividade moluscicida. Resumidamente, cinco

caramujos *B. glabrata* de tamanho uniforme (diâmetro da concha entre 8-10 mm) foram colocados em contato com 30 mL de solução aquosa de concentração conhecida (25 e 250 µg/mL) do extrato vegetal, enquanto grupos de controle foram mantidos em água desclorada. Após 24h, os caramujos foram lavados e mantidos em frascos com água limpa e desclorada e observou-se a ocorrência de

Tabela 1. Resultados dos ensaios de letalidade com *A. salina* e de atividade moluscicida (caramujos adultos e desovas)

Espécie	Parte (g)	Extrato (mg)	<i>Artemia salina</i> (µg/mL)	<i>Biomphalaria glabrata</i> (µg/mL)		
				Caramujos	Desovas	
<i>E. acutangula</i>	Aérea fresca	H (869,0)	-	NT	NT	
		(187,4)	AE (1075,9)	-	NT	NT
		HE (2023,7)	-	-	-	
	Subterrânea fresca	H (145,3)	476,00	NT	NT	
		(111,9)	AE (125,6)	-	NT	NT
		HE (1267,5)	-	-	-	
<i>E. interstincta</i>	Aérea fresca	H (1779,6)	-	NT	NT	
		(207,5)	AE (742,3)	-	NT	NT
		HE (6590,0)	-	-	-	
<i>E. maculosa</i>	Aérea fresca	H (907,8)	-	NT	NT	
		(210,0)	AE (525,4)	-	NT	NT
		HE (3528,5)	-	-	-	
	Aérea seca	H (1485,4)	-	NT	NT	
		(98,6)	C (605,0)	-	NT	NT
		M (8708,1)	-	-	-	
<i>E. sellowiana</i>	Aérea fresca	H (1283,4)	-	NT	NT	
		(270,0)	AE (670,9)	-	NT	NT
		HE (3105,2)	-	-	-	
	Subterrânea fresca	H (358,4)	-	NT	NT	
		(250,5)	C (1303,4)	-	NT	NT
		HE (2984,7)	-	-	24,27	
	Aérea seca	H (2249,3)	-	NT	NT	
		(95,8)	C (211,2)	-	NT	NT
		M (2352,0)	-	-	-	

H: hexano; AE: acetato de etila; HE: hidro-etanólico; C: clorofórmio; M: metanol; (-): inativo; NT: não testado.

Tabela 2. Desenvolvimento comparativo de desovas de *Biomphalaria glabrata* na presença e na ausência de *Eleocharis sellowiana* no aquário

	Ovos viáveis			
	Desenvolvimento com <i>E. sellowiana</i>		Desenvolvimento sem <i>E. sellowiana</i>	
	Vivos	Mortos	Vivos	Mortos
Início	236	0	237	0
Após 24 h	236	0	237	0
Após 3 dias	236	0	235	2
Após 7 dias	236	0	232	5
Após 15 dias	225	11	230	7

mortalidade depois de um período de 24h, utilizando-se como critério ausência de movimento. Os ensaios foram feitos em duplicata.

Atividade moluscicida contra desovas (atividade ovicida)

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Okazaki et al. (1996) com algumas modificações. Desovas de *B. glabrata* foram coletadas através de filmes plásticos colocados na superfície dos aquários dos caramujos. Para cada teste, seis desovas com 20 a 30 ovos, em estágio de blástula (24-h) foram colocadas em contato com 30 mL de solução aquosa do extrato vegetal (25 e 250 µg/mL) enquanto grupos de controle foram colocados em água desclorada. Após um período de exposição de 24h, as desovas foram lavadas em água limpa e mantidas em placas de Petri com água desclorada, a 25 °C durante 15 dias, tempo médio para eclosão dos ovos. Cada desova foi observada em microscópio para verificar a viabilidade dos embriões antes do início do teste, após 24h de contato e no terceiro, sétimo e décimo quinto dias para contagem dos embriões vivos. Os dados foram analisados através do método de Probit (Finney, 1962) e expressos como CL₅₀ (Tabela 1).

Ensaio *in vivo*

Algumas mudas de *E. sellowiana* foram plantadas em um aquário onde algumas desovas (ca. 15 ovos cada) de *B. glabrata* foram colocadas e o desenvolvimento destas foi acompanhado durante 15 dias, tempo médio para eclosão dos ovos. O experimento foi realizado em duplicata e aquários apenas com as desovas foram utilizados como grupo controle (Tabela 2).

RESULTADOS

Todos os extratos obtidos foram testados contra

A. salina enquanto apenas os extratos metanólicos e hidro-etanólicos (solúveis em água) foram testados contra caramujos e desovas de *B. glabrata*. Todos os resultados estão resumidos nas Tabelas 1 e 2, mostrando não haver diferenças significativas entre o material seco ou fresco. Já os extratos das partes subterrâneas mostraram-se mais promissores do que os obtidos das partes aéreas, nas condições empregadas.

DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que extratos obtidos de espécies do gênero *Eleocharis* são submetidos à ensaios de atividade moluscicida e de toxicidade. Dentro da família Cyperaceae, foi encontrado apenas o relato de atividade moluscicida dos extratos de *Cyperus luzulae* contra caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* (Marston et al., 1996).

Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina* indicam uma baixa toxicidade dos extratos testados, uma vez que quase todos apresentaram CL₅₀ >> 10³ µg/mL, exceto o extrato hexânico de *E. acutangula* (parte subterrânea) que apresentou CL₅₀ = 476,00 µg/mL (Tabela 1). A toxicidade com *A. salina* mostra boa correlação com atividades antitumoral, inseticida (Meyer et al., 1982; Mclaughlin et al., 1995) e anti-*Trypanosoma cruzi* (Alves et al., 2000) para substâncias com CL₅₀ < 10³ µg/mL. Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser considerada uma característica interessante para utilização de extratos vegetais em ambientes naturais para controle da população de caramujos. É relevante observar que a niclosamida mostrou-se tóxica para espécies aquáticas como crustáceos do zooplâncton (Oliveira-Filho; Paumgarten, 2000).

Assim, os extratos metanólicos e hidro-etanólicos foram testados para as atividades moluscicida e ovicida por causa de sua solubilidade em água e sua baixa toxicidade. Contra caramujos adultos nenhum dos extratos mostrou-se ativo (Tabela 1) enquanto que o extrato hidro-

etanólico de *E. sellowiana* (parte subterrânea) foi ativo contra desovas de *B. glabrata* ($CL_{50} = 24,27 \mu\text{g/mL}$). Foi interessante observar que as desovas apresentavam-se com aspecto normal até a segunda observação, isto é, grande parte dos embriões morria entre o terceiro e o sétimo dia após a exposição ao extrato. Por causa dessa atividade, propôs-se observar se a planta poderia controlar o desenvolvimento de *B. glabrata* sob condições naturais, uma vez que ambos podem compartilhar o mesmo ambiente úmido. Os resultados obtidos no experimento *in vivo*, entretanto, não confirmaram essa hipótese uma vez que não houve diferenças significativas na mortalidade de desovas entre os aquários com e sem *E. sellowiana* (Tabela 2).

Dessa forma, a atividade ovicida observada para o extrato hidro-etanólico de *E. sellowiana* (parte subterrânea), aliada à baixa toxicidade e a facilidade de preparo e de solubilidade em água desse extrato, sugere que o mesmo pode vir a ser empregado no controle de populações de caramujos *B. glabrata*, ressaltando ainda que *E. sellowiana* ocorre naturalmente em quase todo o Brasil e pode ser facilmente cultivada. Estas características são algumas daquelas apresentadas por Clark et al (1997) como importantes na escolha de um moluscicida ideal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro e pelas bolsas de estudo concedidas a Ana Lúcia T. G. Ruiz, Aparecida D. de Faria and Deborah R. Serrano. A Profa. Dra. Maria do Carmo E. do Amaral também agradece ao CNPq por uma bolsa de pesquisa. Este trabalho é parte da tese de doutorado de Ana Lúcia T. G. Ruiz.

REFERÊNCIAS

- Alves TMD, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia A, Zani CL 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- Amaral MCE, Faria AD, Magalhães AF, Magalhães EG, Ruiz ALTG 2004. Steroids and triterpenes from *Eleocharis acutangula* and *Eleocharis sellowiana* (Cyperaceae). *Phytochem Anal* 15: 125-129.
- Clark TE, Appleton CC, Drewes SE 1997. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides – A South African application. *J Ethnopharmacol* 56: 1-13.
- Faria AD 1998. *O gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Campinas, 200p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Finney DJ 1962. *Probit Analysis*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Lima NMF, Santos AF, Profírio Z, Goulart MOF, Sant'ana AEG 2002. Toxicity of lapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83: 43-47.
- Magalhães AF, Tozzi AMGA, Santos CC, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães EG, Magalhães LA 2003. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 713-718.
- Marston A, Dudan G, Gupta MP, Solis PN, Correa MD, Hostettmann K 1996. Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. *Int J Pharm* 34: 15-18.
- Mclaughlin JL, Saizarbitori T-C, Anderson JE 1995. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Rev Soc Venez Quim* 18: 13-18.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL 1982. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.
- Nick A, Rali T, Sticher O 1995. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. *J Ethnopharmacol* 49: 147-156.
- Okazaki K, Andrade Junior HF, Kawano T 1996. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Braz J Med Biol Res* 29: 1057-1067.
- Oliveira-Filho EC, Paumgarten FJR 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotox Environ Safe* 46: 342-350.
- Paraense WL, Correa LR 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop* 5: 15-22.
- Ruiz ALTG 2003. *Estudo fitoquímico de algumas espécies do gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica*. Campinas, 200p. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- Tang SH, Whitfield PJ, Perrett S 1995. Activity of the molluscicidal plant *Milletia thonningii* (Leguminosae) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. *J Parasitol* 81: 833-835.
- Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF 1997. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. IV – Infeciosidade dos miracídeos. *Rev Saude Publ* 31: 448-494.