

Avaliação da atividade moluscicida da *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae)

Andréa Brustolin e Diógenes Aparício Garcia Cortez*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. A *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae) é uma trepadeira lenhosa nativa da Índia. As folhas são utilizadas na medicina popular como antidiabética, estomáquica, diurética refrigerante, adstringente e tônica. O extrato metanólico bruto e suas frações das partes aéreas foram utilizados para avaliar a atividade moluscicida de caramujos (*Biomphalaria glabrata*). O extrato metanólico bruto e suas frações foram analisados em cromatografia em camada delgada, determinados os índices hemolítico e de espuma; e realizados os ensaios físico-químicos das partes aéreas desta espécie. Das cinco frações obtidas do extrato metanólico bruto, a fração metanólica apresentou maior atividade moluscicida e demonstrou a presença de compostos hemolíticos em cromatografia de camada delgada.

Palavras-chave: *Gymnema sylvestre*, Asclepiadaceae, efeitos moluscicida e hemolítico.

ABSTRACT. Evaluation of molluscicidal activity of *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae). *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae) is a native plant found in India. The leaves are used in folk medicine as antidiabetic, stomachic, diuretic, astringent and tonic. The methanolic extract and fractions obtained from aerial parts were used to evaluate the molluscicidal activity against the snail (*Biomphalaria glabrata*). The methanolic extract and its fractions were analyzed by thin-layer chromatography, foam and the hemolytic index were measured, and the physical and chemical characteristics of aerial parts of this species were analyzed. The methanolic extract yielded five fractions, the methanolic fraction presented molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* and showed content of hemolytic compound by thin-layer chromatography.

Key words: *Gymnema sylvestre*, Asclepiadaceae, molluscicidal effects and hemolytic.

A presença de caramujos (*Biomphalaria glabrata*) em rios e lagos é responsável pela área contínua de transmissão da esquistossomose em várias partes do Brasil e do mundo (Neves *et al.*, 1995). Mais de 200 milhões de pessoas, das quais 70% encontram-se em países tropicais e subtropicais estão afetadas por esta doença endêmica (Hostettmann *et al.*, 1982). Um dos métodos de controle da esquistossomose é a utilização de moluscicidas naturais extraídos de plantas, os quais são biodegradáveis, não afetam o meio ambiente, nem matam plantas e animais. O uso de moluscicidas naturais é uma alternativa mais barata para países de terceiro mundo, que são os mais afetados por esta doença. Desde a descoberta de saponinas ativas, como as isoladas da *Phytolacca dodecandra*, esta classe de compostos tem merecido uma atenção especial (Thiilborg *et al.*, 1996).

A *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae) é uma trepadeira lenhosa nativa da Índia, conhecida popularmente como “destruidora de açúcares”. Suas folhas foram utilizadas pela medicina popular durante mais de 2000 anos para o tratamento do diabetes, atribuindo propriedades estomáquica, diurética refrigerante, adstringente e tônica (Kapoor, 1990). A partir das folhas da *Gymnema sylvestre*, foram isolados quercetol, lupeol β -amirina, estigmasterol e saponinas, sendo que o ácido gimnêmico I, II, III e IV, tem sido reportado como hipoglicemiante (Liu *et al.*, 1992). Neste trabalho nós propomos avaliar a atividade moluscicida do extrato metanólico bruto de suas frações e estabelecer uma relação entre esta atividade e o conteúdo de saponinas presentes nestas espécies. Em adição foram realizados ensaios físico-químicos das partes aéreas da *Gymnema sylvestre* para auxiliar o controle de qualidade desta espécie vegetal.

Material e métodos

Coleta e identificação do material botânico

Uma amostra comercial das partes aéreas secas da *Gymnema sylvestre* (1 Kg) foi adquirida na cidade de Bombay (Índia), em junho de 1999, e a análise botânica foi realizada na amostra de acordo com Blatter (1930).

Obtenção do extrato metanólico bruto

As partes aéreas da *Gymnema sylvestre* (100 g) foram pulverizadas em moinho de martelos. O pó da planta foi extraído em um extrator Soxhlet utilizando-se metanol/água (4: 1). O solvente foi evaporado em rotaevaporador a uma temperatura de 45°C; após a eliminação do solvente, o material foi liofilizado, obtendo-se 14,96 gramas e armazenado a uma temperatura de -15°C.

Análise físico-química

Determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido (Farmacopéia Brasileira, 1977)

Cinzas totais. Uma amostra de 3 g do material pulverizado, exatamente pesado, foi colocada em cápsula de porcelana previamente calcinada. A cápsula mais a amostra foram incineradas aumentando a temperatura gradualmente da mufla até o máximo de 450°C, até a liberação total do carbono da amostra. O material foi resfriado e pesado.

Cinzas insolúveis em ácido. A cinza obtida acima foi fervida com 25 mL de ácido clorídrico a 10%, e o precipitado foi recolhido em um papel de filtro isento de cinza e lavado com água quente. O papel de filtro mais o resíduo foram incinerados a uma temperatura de 800°C até peso constante.

Determinação do pH. Foi realizado em potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 7,00 e 4,00 LABORCLIN, respectivamente (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Determinação da perda por dessecação. Amostras de 2,0 g de droga vegetal pulverizadas foram exatamente pesadas, em pesa-filtros previamente tarados, e colocadas em estufa por 2 horas, à temperatura de 105°C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Determinação do teor de extrativos (Deutsches Arzneibuch, 1994). Cerca de 1,0 g da droga vegetal pulverizada foi submetida à decocção com 100,0 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100,0 mL. A solução restante foi filtrada em papel de filtro, e os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Do restante do filtrado foi pesado uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado e evaporado até secar em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105°C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m} \quad \text{onde: TE = teor de extrativos (\%; m/m)}$$

g = massa de resíduo seco (g)
m = massa da amostra (g)
FD = fator de diluição (5)

Determinação do teor de resíduo seco. Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até secar em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 horas à temperatura de aproximadamente 105°C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações (Deutsches Arzneibuch, 1994).

Análise de saponinas no extrato metanólico bruto

Determinação do índice de espuma (WHO, 1992).

Determinação do índice hemolítico (WHO, 1992).

Obtenção da solução do extrato metanólico bruto da *Gymnema sylvestre*. 40 mg do extrato metanólico bruto foram colocados em balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos com uma solução tampão fosfato, pH 7,0.

Fracionamento do extrato metanólico bruto da *Gymnema sylvestre*.

O extrato metanólico bruto (E) (5 g) foi submetido a uma cromatografia à vácuo, utilizando como adsorvente o Avicel®. Foram utilizados solventes de polaridade crescentes hexano (F1), diclorometano (F2), acetato de etila (F3), metanol (F4) e metanol/água (1: 1) (F5). Após a evaporação do solvente e liofilização das frações, obteve-se F1 (0,10 g), F2 (0,32 g), F3 (0,12 g), F4 (4,18 g) e F5 (0,24 g).

Determinação do perfil cromatográfico do extrato metanólico bruto (Wagner *et al.*, 1984).

Sistema cromatográfico 1. Cromatofolhas AL TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (MERCK)- 10X10 cm- 0,2 mm

Fase móvel: n-butanol: ácido acético: água (25: 5: 2).

Visualização: UV₂₅₄ após nebulização do reativo vanilina/ácido sulfúrico, seguida de aquecimento a 105° C por 10 minutos.

Sistema cromatográfico 2. Cromatofolhas AL TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (MERCK)- 10X10 cm- 0,2 mm

Fase móvel: n-butanol: ácido acético: água (25: 5: 2)

Visualização: UV₂₅₄, após nebulização com reagente de sangue (BL). A detecção foi observada pela zona de hemólise.

Atividade Moluscicida (Hostettmann *et al.*, 1982; Alvim *et al.*, 1982).

O ensaio moluscicida foi realizado com o extrato metanólico bruto (E) da *Gymnema sylvestre* e das frações F1, F2, F3, F4 e F5, utilizando-se caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Foram utilizados caramujos criados em aquário de tamanho uniforme (diâmetro de 9 mm) e ensaiados com o extrato e as frações, numa concentração de 400 ppm em duplicata. Os caramujos ficaram em contato com esta solução por 24 horas, à temperatura ambiente. Após este tempo, foram observados os batimentos cardíacos através de uma lupa para observar a mortalidade em 100%. Para avaliar a atividade moluscicida mínima do extrato metanólico bruto e das frações F1-5, foram realizadas diluições decrescentes em água destilada de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 ppm em duplicatas, com a finalidade de determinar a quantidade mínima para causar 100% de morte. O grupo controle positivo recebeu o moluscicida sintético Bayluscid®, nas diluições acima referidas.

Resultados e discussão

Os dados físico-químicos (Tabela 1) da amostra comercial foram determinados para servir de parâmetros de comparação com as amostras comercializadas no Brasil, encontradas na forma de pó e embaladas em cápsulas gelatinosas duras. Não foram encontrados, na literatura, parâmetros de controle de qualidade para esta espécie, muito utilizada como tratamento complementar em diabetes. Das partes aéreas da *Gymnema sylvestre* foram isoladas saponinas (Liu *et al.*, 1992), e os índices de espuma e hemolítico *Gymnema sylvestre* encontrados foram de 1: 227 e 1: 6.666, estando de acordo com a presença desta classe de

compostos nesta espécie. O extrato metanólico bruto (E) das partes aéreas *Gymnema sylvestre* causou mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* a partir de 200 ppm. Foram testadas frações obtidas do fracionamento do extrato E, e a fração que apresentou maior atividade foi a fração F4 causando mortalidade a partir de 100 ppm (Tabela 2).

Na análise por cromatografia em camada delgada (Figura 1) do extrato metanólico bruto E e das frações F1 a F5 da *Gymnema sylvestre*, pôde-se observar que as frações obtidas do extrato metanólico E apresentam composição química diferente quando reveladas com o reativo vanilina/ácido sulfúrico. Outra placa cromatográfica foi desenvolvida nas mesmas condições deste experimento e foi nebulizada com reagente de sangue (BL) (Figura 2) para verificar a presença de compostos hemolíticos. Como padrão utilizou-se 5µg de saponina MERCK (S) sobre a cromatoplaça. A saponina (S), o extrato metanólico (E) e as frações F3 e F4 apresentaram compostos na sua composição com hemólise. A fração F4 (50µg) apresentou, em sua composição, um halo de hemólise de uma intensidade semelhante ao de S. Sendo esta fração a mais ativa frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata*, pode-se supor que a atividade biológica esteja também relacionada com este(s) composto(s) hemolíticos observados na cromatografia em camada delgada.

Tabela 1. Análise físico-química das partes aéreas da *Gymnema sylvestre*

Determinação cinzas totais	11,60%
Determinação cinzas insolúveis em ácido	1,50%
Determinação do pH	6,3
Determinação da perda por dessecação	6,5%
Determinação do teor de extrativos	22%
Determinação do teor de resíduo seco	2,11%

Tabela 2. Atividade moluscicida sobre a *Biomphalaria glabrata* do extrato metanólico bruto da *Gymnema sylvestre* (E), das frações F1, F2, F3, F4, F5 e o moluscicida sintético Bayluscid® que foi utilizado como controle positivo (C)

	C		E		F1		F2		F3		F4		F5	
	tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição		tempo de exposição	
Concentração em ppm	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h
400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
100	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
50	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,56	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : inativo + : 100% letal

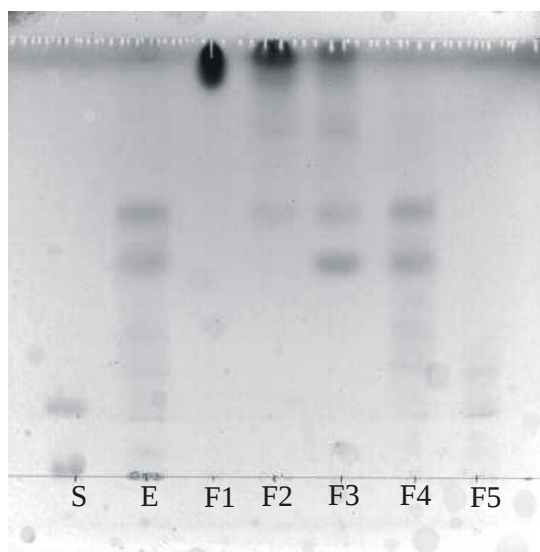


Figura 1. Cromatogramas A (sistema cromatográfico 1): (S) 5µg de saponina Merck, (E) 100 µg do extrato metanólico bruto das partes aéreas *Gymnema sylvestre* e das frações (F1) 50µg, (F2) 50µg, (F3) 50µg, (F4) 50µg e (F5) 50µg

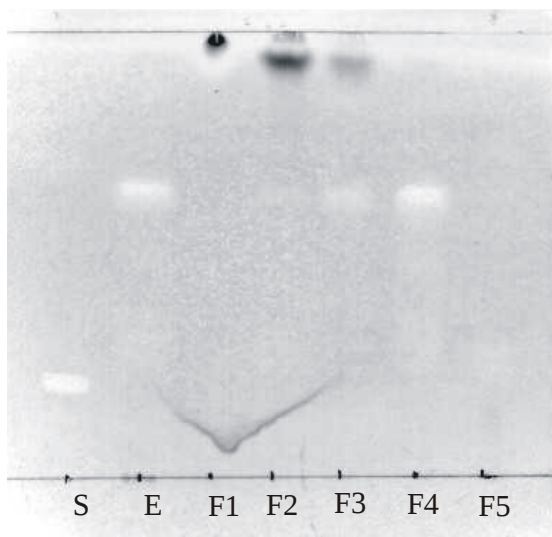


Figura 2. Cromatogramas B (sistema cromatográfico 2): (S) 5µg de saponina Merck, (E) 100 µg do extrato metanólico bruto das partes aéreas *Gymnema sylvestre* e das frações (F1) 50µg, (F2) 50µg, (F3) 50µg, (F4) 50µg e (F5) 50µg

Agradecimento

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- Alvim, N.R.; Cunha, K.C.T.; Cortez, L.E.; Bazotte, R.B.; Marques, L. C.; Cortez, D. A. G. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). *Acta Scientiarum*, 21(2) 349-352, 1999.
- Blatter, E.; Caius, J.F.; Mhaskar, K.S. *Indian medicinal plants*, 2.ed. Allahad, India: Lalit Mohan Basu, 1930. p. 1625-1627. v.3.
- Deutsches Arzneibuch. 10. Ausgabe, Stuttgart, Deutscher Apotheker, 1994.
- Farmacopéia brasileira. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1977.
- Farmacopéia brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- Hostettmann, K.; Kizu, T.; Tomimori, T. Molluscicidal properties of various saponins. *Planta Med.*, 44:34-35, 1982.
- Kapoor, L.D. *Handbook of ayurvedic medicinal plants*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1990. p. 200-201.
- Liu, H.M.; Kiuchi, F.; Tsuda, Y. Isolation and structure elucidation of gymnemic acids, antisweet principles of *Gymnema sylvestre*. *Chem. Pharm. Bull.*, 40(6):1366-1375, 1992.
- Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M. *parasitologia Humana*. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 212-237.
- Thiilborg, S.T.; Cornett, C.; Lemmich, E. Investigations of molluscicidal saponins from the Endod plant *Phytolacca dodecandra*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 404:151-64, 1996.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. *Plant drug analysis*. New York: Springer-Verlag, 1984. 320 p.
- World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Genebra: WHO/Pharm/92.559, 1992. p. 33-35.

Received on March 29, 2000.

Accepted on May 18, 2000.