Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
35(6): 509-513, novembro-dezembro, 1993

ENSAIOS PRELIMINARES DO *Guaiacum officinale L.* COMO MOLUSCICIDA

Nelymar Martineli MENDES (1), José D. GÓMEZ (2), Neusa ARAÚJO (1), Carlos Leomar ZANI (1) & Naftale KATZ (1)

RESUMO

Suspensões aquosas do pericarpo do fruto, da casca da raiz, das folhas e das sementes de *Guaiacum officinale* foram testadas como moluscicida, cercaricida e piscicida em diferentes concentrações. Em laboratório, a suspensão do pericarpo do fruto apresentou 100% de mortalidade a 100 ppm para desovas de *B. glabrata*, a 20 ppm para caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, a 5 ppm para *Lebistes reticulatus* (peixes) e a 1 ppm para cercárias de *Schistosoma mansoni*. O extrato etanólico do pericarpo do fruto não foi ativo para caramujo adulto de *B. glabrata*. As doses letais para 90% dos caramujos adultos (DL_{90}), após 24 horas de exposição, usando a suspensão do pericarpo do fruto foram de: 15 ppm para *B. glabrata*; 14 ppm para *B. straminea* e 18 ppm para *B. tenagophila*. As DL_{90} das suspensões das casca da raiz, sementes e folhas contra *B. glabrata* foram de 57, 33 e 15 ppm, respectivamente. No campo, com a suspensão do pericarpo do fruto a mortalidade de caramujos adultos de *B. glabrata* foi de 68% a 20 ppm e 100% a 40 ppm.

UNITERMOS: *Guaiacum officinale*; Moluscicida.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença endêmica em 76 países, estimando-se que existam cerca de 600 milhões de indivíduos expostos e 200 milhões infectados[20]. De uma maneira geral, o controle da transmissão desta enfermidade envolve medidas como educação e saneamento, quimioterapia dos indivíduos infectados e uso localizado de moluscicida. A necessidade de moluscicidas eficientes e ecologicamente aceitáveis tem impulsionado a pesquisa de plantas que contenham substâncias ativas visando o desenvolvimento de moluscicidas alternativos[15]. Neste contexto, a partir dos frutos da *Phytolacca dodecandra* L'Herit (Phytolaccaceae) (*endod*), uma planta da África, que demonstrou ação moluscicida em laboratório e no campo[16], foram patenteados vários produtos moluscicidas[14, 17].

Recentemente foi demonstrado que o extrato aquoso dos frutos do guaiaco (*Guaiacum officinale L.* - Zygophyllaceae) apresentou 92,5 % de mortalidade para caramujos de *Biomphalaria glabrata* na concentração de 1 ppm[10].

O óleo resinóide da casca, lenho e folhas obtido do *G. officinale* é usado popularmente como antisifilítico, antireumático e para debelar o catarro dos brônquios[9, 11].

Exames preliminares da suspensão aquosa dos frutos do guaiaco realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou indicaram que a ação moluscicida se concentrava na fração rica em saponinas.

Projeto parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo nº 525/90.
(1) Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
(2) Centro de Investigaciones Biológicas y Adiestramiento, Inc., Santo Domingo, República Dominicana.
Endereço para correspondência: Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

O *G. officinale* tem sido objeto de estudo pelo grupo do Prof. Ahmad que desde 1984 isolou e identificou dezessete saponinas triterpenoidais monodesmosídicas ou bidesmosídicas dos frutos, casca do caule e folhas, denominadas guaianinas e guaiacinas[1-7].

No presente trabalho, visando ampliar o conhecimento sobre a atividade do *G. officinale*, foram estudadas em laboratório as suspensões aquosas dos pericarpo do fruto, casca da raiz, folhas e sementes sobre caramujos adultos e/ou desovas de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e sobre *Lebistes reticulatus* (piaba). No campo foram tratados criadouros artificiais de *B. glabrata* usando a suspensão aquosa do pericarpo do fruto.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos, folhas e casca da raiz do *G. officinale* foram coletados em abril de 1990, na cidade de Bani, República Dominicana, secos em estufa a 35°C e triturados em liquidificador e/ou moinho de facas.

As "suspensões estoque" dos pericarpo do fruto, folhas, sementes e casca da raiz foram preparadas a partir de 1g do material vegetal triturado em 250 mL de água desclorada (4000 ppm), solubilizada através do processador de ultra-som de alta intensidade durante trinta minutos e divididas em duas partes. Uma parte foi diluída e usada imediatamente nos testes biológicos e a outra diluída e testada após vinte e quatro horas de repouso. O extrato etanólico do pericarpo do fruto foi obtido, por maceração, à temperatura ambiente por vinte e quatro horas e o solvente removido sob vácuo em evaporador rotatório.

Ensaios Biológicos em laboratório

Teste como moluscicida: Os experimentos preliminares foram realizados usando-se dez caramujos adultos e/ou duas desovas (60 a 95 ovos) de *B. glabrata*, *B. straminea* e/ou *B. tenagophila*. Para os cálculos das doses letais para 90% dos caramujos (DL_{90}) foram usados dez planorbídeos em triplicata (total de trinta). As suspensões do guaiaco foram ensaiadas nas concentrações de 1, 5, 10, 12, 14, 15, 20, 50 e/ou 100 ppm. Os moluscos e as desovas utilizados, descendentes de exemplares coletados na Pampulha, Belo Horizonte, MG (*B. glabrata* e *B. tenagophila*) e em Paracatu, MG (*B. straminea*), foram criados no laboratório[19].

Os exemplares de *B. glabrata* mediam 13-15 mm de diâmetro, os de *B. straminea*, 8-11 mm e os de *B. tenagophila*, 8-15 mm. As desovas usadas tinham de 0-1 dia de idade.

Teste como cercaricida: Grupos de aproximadamente 500 cercárias de *S. mansoni* foram colocados em contato com a suspensão aquosa do pericarpo do fruto do guaiaco nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 ppm. A observação da mortalidade foi realizada em microscópio estereoscópico após 5, 15 e 30 minutos de contato[22].

Teste como piscicida: Dez exemplares de *L. reticulatus* criados em laboratório foram colocados em frascos com 250 ml. da suspensão aquosa do pericarpo do fruto do guaiaco nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 ppm. Os peixes mediam 23-24 mm de comprimento. O tempo de exposição foi de 24 horas[21].

Em todos os ensaios biológicos foi usada água desclorada como controle. A temperatura e o pH das suspensões foram medidos no início e no final de cada experimento.

Os cálculos das doses letais para 90% de mortalidade dos moluscos, (DL_{90}) em ppm, das suspensões aquosas dos pericarpo do fruto, casca da raiz, folhas e sementes foram realizados através do método *probit* de análise. Usou-se trinta planorbídeos para o cálculo do DL_{90}. O critério de avaliação da atividade moluscicida adotado foi o estabelecido pela Organização Mundial de Saúde, qual seja, uma planta é considerada promissora quando sua solução ou suspensão produz 90% de mortalidade de moluscos (DL_{90}) na concentração igual ou inferior a 100 ppm após 24 horas de exposição. Já os extratos devem apresentar DL_{90} menores ou iguais a 20 ppm[25].

Ensaios Biológicos no campo

A suspensão aquosa do pericarpo do fruto do guaiaco foi testada em criadouros artificiais de *B. glabrata*, constituído de poços aproximadamente cilíndricos, localizados no Centro de Reeducação de Neves, Ribeirão das Neves, MG, a 40 km de Belo Horizonte. O volume de água de cada poço foi calculado pela fórmula $V = \pi \cdot R^2 \cdot h$ (V = volume; R = raio; h = profundidade; π = 3,14). Os valores do diâmetro e da profundidade foram obtidos através da média de três medidas do diâmetro e cinco medidas da profundidade. Foram usados três poços denominados A, B, e C. Nos poços A e B foram aplicadas as suspensões nas concentrações de

20 e 40 ppm, respectivamente, enquanto o poço C serviu de controle. A temperatura e o pH da água foram registrados no início e no final do experimento. Após vinte e quatro horas de exposição nos três criadouros, todos os moluscos dos poços A, B e C foram coletados e transportados para o laboratório em recipientes separados. Foi feita a contagem do número de planorbídeos capturados, a mensuração das conchas, o registro e retirada dos exemplares mortos. Os moluscos vivos foram colocados em frascos com água desclorada e pedaços de alface para alimento, permanecendo em observação durante 24 horas.

O efeito residual da suspensão aquosa do pericarpo do fruto foi avaliado através de experimentos em condições controladas de laboratório (experimento 1) e em condições de campo (experimento 2). No experimento 1, sete litros de água dos poços B (40 ppm) e C (controle) foram coletados 24 horas após a adição da suspensão, levados para o laboratório e colocados em reservatórios de plástico, aos quais, acrescentou-se 50 g de latossolo esterilizado e carbonato de cálcio na proporção de $1:10^{24}$. No experimento 2, amostras de água dos poços B e C foram coletados diariamente, durante sete dias e levadas para o laboratório. As amostras dos experimentos 1 e 2 foram ensaiadas sobre grupos de dez exemplares de *B. glabrata* (7-20 mm) criados em laboratório. Todos os dias foram retirados e registrado o número de planorbídeos mortos em cada um dos experimentos até que se completasse o período de noventa e seis horas de observação.

RESULTADOS

Experimentos em laboratório

Inicialmente observou-se que a atividade moluscicida das preparações das suspensões aquosas do guaiaco só se manifestou após vinte e quatro horas e que o extrato etanólico do pericarpo do fruto não apresentou atividade sobre caramujos de *B. glabrata* na concentração de 100 ppm. Assim, a suspensão aquosa do pericarpo do fruto apresentou 100% de mortalidade para desovas de *B. glabrata*, caramujos adultos de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, grupos de *L. reticulatus* e cercárias de *S. mansoni* nas concentrações de 100, 20, 5 e 1 ppm, respectivamente. Todavia, esta suspensão não foi ativa para desovas de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* nas concentrações de 20 ppm.

As suspensões aquosas das cascas da raiz, sementes e folhas apresentaram 100% de mortalidade para moluscos de *B. glabrata* nas concentrações de 100, 50 e 20 ppm, respectivamente.

Dentre as partes da planta testadas contra *B. glabrata* o pericarpo do fruto provocou intensa hemorragia nos caramujos, após duas horas de exposição, enquanto que nas folhas este efeito só foi observado após vinte e quatro horas.

Em vista destes resultados, um estudo mais detalhado para a determinação das doses letais (DL_{90}) foi realizado utilizando-se diluições sucessivas das suspensões aquosas do pericarpo do fruto, da casca da raiz, das folhas e das sementes do guaiaco (preparadas vinte e quatro horas antes) sobre caramujos adultos de *B. glabrata*, *B. straminea* e/ou *B. tenagophila*. As doses letais para 90% dos moluscos (DL_{90}) das suspensões aquosas dos pericarpo do fruto, casca da raiz, folhas e sementes estão representadas na Tabela 1. As DL_{90} do pericarpo do fruto foram: 15 ppm para *B. glabrata*; 14 ppm para *B. straminea* e 18 ppm para *B. tenagophila*. As DL_{90} para caramujos de *B. glabrata* foram: 57 ppm para a casca da raiz; 33 ppm para as sementes e 15 ppm para as folhas (Tabela 1).

A temperatura das suspensões variou entre 23 e 24°C e o pH de 6 a 7.

Experimentos no campo

Os resultados obtidos no campo estão representados na Tabela 2. O diâmetro dos caramujos coletados variou entre 6 e 22 mm. A temperatura da água dos poços oscilou entre 18 e 22° C e o pH manteve-se constante em 6 durante o experimento.

A suspensão do pericarpo do fruto provocou 68% de mortalidade de *B. glabrata* no poço A (20 ppm) e

Tabela 1

Doses letais (DL_{90}) em ppm das suspensões aquosas dos pericarpo do fruto, casca da raiz, folhas e sementes do *Guaiacum officinale* testados sobre caramujos adultos do gênero *Biomphalaria* em laboratório.

Parte testada	DL_{90}	*Biomphalaria*
casca da raiz	57	*B. glabrata*
Folhas	15	*B. glabrata*
Pericarpo do fruto	15	*B. glabrata*
	14	*B. straminea*
	18	*B. tenagophila*
Sementes	33	*B. glabrata*

No grupo controle não houve mortalidade.

Tabela 2

Atividade moluscicida de suspensão aquosa dos frutos do *Guaiacum officinale* testada em poços artificiais de criadouros de *Biomphalaria glabrata* nas concentrações de 20 e 40 ppm.

Poço	Volume em litros	Concentração em ppm	Nºs de caramujos Mortos/Total	(%)
A	134	20	19/28	68
B	176	40	20/20	100
C	194	Controle	0/26	0

100% no poço B (40 ppm). No poço não tratado (C) nenhum planorbídeo morreu.

Nas condições controladas de laboratório (experimento 1), o efeito residual (100% de mortalidade) da suspensão aquosa do pericarpo do fruto na concentração de 40 ppm foi de cinco dias. No experimento 2 (condições de campo), este efeito foi de vinte e quatro horas. Nos grupos controles dos dois experimentos não morreu nenhum caramujo.

DISCUSSÃO

Num estudo sobre a relação entre atividade moluscicida e estrutura de uma série de vinte e quatro saponinas isoladas de diferentes espécies vegetais HOSTETTMANN et al. constataram que as triterpenoidais monodesmosídicas apresentaram atividade sobre *B. glabrata*, enquanto as bidesmosídicas foram totalmente inativas, indicando a necessidade do grupo carboxila livre em *C-18* para a expressão da atividade moluscicida[12, 18].

AHMAD et al. isolaram duas saponinas bidesmosídicas dos frutos de *G. officinale*, denominadas guaianinas F e G[7]. Nossos experimentos mostraram que a atividade moluscicida das suspensões aquosas do guaiaco só se manifestou após vinte e quatro horas de suas preparacões, o que poderia ser explicado pela hidrólise enzimática das saponinas bidesmosídicas presentes no pericarpo do fruto gerando as monodesmosídicas ativas, como observado para os frutos da *Phytolacca dodecandra*[13] .

Em testes anteriores, realizados na República Dominicana, a DL_{90} sobre caramujos adultos de *B. glabrata* do extrato aquoso do fruto do guaiaco foi de 0,95 ppm[10], enquanto que no presente trabalho os experimentos em laboratório mostraram que a DL_{90} sobre caramujos adultos de *B. glabrata* foi de 15 ppm, fato este provavelmente devido a diferenças intraespecíficas tanto do vegetal quanto do molusco[8].

A suspensão aquosa do pericarpo do fruto foi 6,7 vezes menos ativa sobre desovas de *B. glabrata* do que sobre caramujos adultos de *B. glabrata* confirmando observações anteriores[16, 21, 23]. A ação tóxica sobre peixes foi três vezes maior que sobre caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*. Salienta-se que a atividade moluscicida foi semelhante contra as três espécies do gênero *Biomphalaria* estudadas.

Em vista destes resultados, o pericarpo do fruto e as folhas do guaiaco podem ser considerados como moluscicidas naturais promissores, restando agora realizar estudos para o isolamento e identificação dos princípios ativos, bem como sobre a toxicologia deste material e seus componentes.

SUMMARY

Preliminary tests of *Guaiacum officinale L.* as molluscicide.

Aqueous suspensions of fruit's pericarp, leaves, root's bark and seeds of *Guaiacum officinale* were tested at different concentrations as molluscicide, cercaricide and piscicide. In the laboratory the suspension of fruit's pericarp produced 100% mortality for egg masses of *B. glabrata* at 100 ppm, for adult snails of *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* and *B. tenagophila* at 20 ppm, for *Lebistes reticulatus* (fishes) at 5 ppm and *Schistosoma mansoni's* cercariae at 1 ppm. The ethanolic extract of fruit's pericarp was not active against adult snails of *B. glabrata*. The letal dose for adult snails(DL_{90}) of the aqueous suspension of fruit's pericarp after 24 hours exposure, were: 15 ppm for *B. glabrata*; 14 ppm for *B. straminea* and 18 ppm for *B. tenagophila*. The DL_{90} of aqueous suspensions of root's bark, seeds and leaves were 57 ppm, 33 ppm and 15 ppm, respectively. In the field, *B. glabrata* adult snail mortality was 68% at 20 ppm and 100% at 40 ppm, when using suspension of fruit's pericarp.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cecília Pereira de Souza, do Laboratório de Malacologia do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo fornecimento dos caramujos, desovas, cercárias e peixes; ao Sr. Moacyr Rodrigues da Silva, do Laboratório

de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou, pela ajuda nos testes de campo e à Silvia Gisele Garcia Barbosa, estagiária do Laboratório de Química de Produtos Naturais, pela ajuda nas preparações das suspensões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMAD, V.U. ; BANO, N.; BANO, S. ; UDDIN, S.; PERVEEN, S. & FATIMA, I. - Structure of guaianin C from *Guaiacum officinale*. **Fitoterapia, 60**: 255-256, 1989.

2. AHMAD, V.U. ; BANO, N.; FATIMA, I. & BANO, S. - Isolation of two saponins, guaianin D and E from the bark of *Guaiacum officinale*. **Tetrahedrom, 44**: 247-252, 1988.

3. AHMAD, V.U.; BANO, S.; FATIMA, I. & BANO, N. - Saponins from stem bark of *Guaiacum officinale*. **J. chem. Soc. Perk., 10**: 247-251, 1988.

4. AHMAD, V.U.; BANO, S.; FATIMA, I. & BANO, N. - Triterpenoid saponins of *Guaiacum officinale*. **Gazz. chim. ital., 119**: 31-34, 1989.

5. AHMAD, V.U.; PERVEEN, S. & BANO, S. - Guaiacin A and B from leaves of *Guaiacum officinale*. **Planta med.** (Stuttg.), **55**: 307-308, 1989.

6. AHMAD, V.U.; PERVEEN, S. & BANO, S. - Saponins from the leaves of *Guaiacum officinale*. **Phytochemistry, 29**: 3287-3290, 1990.

7. AHMAD, V.U.; UDDIN, S.; BANO, S. & FATIMA, I. - Two saponins from fruits of *Guaiacum officinale*. **Phytochemistry, 28**: 2169-2171, 1989.

8. CHINGAITE, T.M. - Studies on the distribution and vegetative propagation of *Phytolacca dodecandra* (Ipoko) in Zambia. In: LEMMA, A; HEYNEMAN, D. & SILANGWA, S.M., ed. *Phytolacca dodecandra* (endod). Dublin, Ireland, Tycooly International Publishing, 1984. p. 130-132.

9. CORRÊA, M.P. & PENNA, L.A. - **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional; Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984. v.6,p. 521-523.

10. GÓMEZ, J.D.; MALEK, E.A. & VARGAS, M. - Estudio preliminar de las propriedades mollusquicidas del guayacil: extracto crudo de *Guayacum officinale*. **Rev. cuba. Med. trop., 41**: 236-241, 1989.

11. HOEHNE, F.C. - **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais.** São Paulo, Departamento de Botânica do Estado, 1939. p. 152.

12. HOSTETTMANN, K.; KIZU, H. & TOMIMORI, T. - Molluscicidal properties of various saponins. **Planta med.** (Stuttg), **44**: 34-35, 1982.

13. HOSTETTMANN, K. & MARSTON, A. - Plant molluscicide research: an update. In: MOTT, K. E., ed. *Plant molluscicides*. Chichest, UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; John Wiley & Sons, 1987. p. 299-320.

14. JEWERS, K. & KING, T.A. - Improvements relating to molluscicides. London, **The Patent Office**, 1972. (Patent Nº 1277417).

15. KLOOS, H. & McCULLOUGH, F.S. - **Plants with recognized molluscicidal activity.** In: MOTT, K.E., ed. *Plant molluscicides*. Chichest, UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; John Wiley & Sons, 1987. p. 45-108.

16. LEMMA, A. - Laboratory and field evaluation of the molluscicidal properties of *Phytolacca dodecandra*. **Bull. Wld. Hlth. Org., 42**: 597-612, 1970.

17. LEMMA, A. ; ABABA, A. ; PARKHURST, R.M. ; PARK, M. & SKINNER, W.A. - Method of producing a molluscicide from endod. **United States Patent Office**, 1974 (Patent Appl. Nº 3813383).

18. MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. - Review article number 6: *plant molluscicides*. **Phytochemistry, 24**: 639-652, 1985.

19. MENDES, N.M. ; ARAÚJO, N. ; SOUZA, C.P. ; PEREIRA, J.P. & KATZ, N. - Atividade moluscicida e cercaricida de diferentes espécies de *Eucalyptus*. **Rev. Soc. bras. Med. trop., 23**: 197-199, 1990.

20. MOTT, K.E. - Contrast in control of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84** (suppl. 1) : 3-19, 1989.

21. PEREIRA, J.P. & SOUZA, C.P. - Ensaios preliminares com "*Anacardium occidentale*" como moluscicida. **Ciênc. e Cult., 26**: 1054-1057, 1974.

22. PEREIRA, J.P. ; SOUZA, C.P. & MENDES, N.M. - Propriedades moluscicidas da *Euphorbia cotinifolia L.* **Rev. bras. Pesq. méd. biol., 11**: 345-351, 1978.

23. ROUQUAYROL, M.Z.; SOUZA, M.P. & MATOS, F.J.A. - Atividade moluscicida de *Pithecelobium multiflorum*. **Rev. Soc. bras. Med. trop., 7**: 11-19, 1973.

24. SOUZA, C.P. & CLARK LIMA, L. - *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. Belo Horizonte, FIOCRUZ, 1990. p. 1-76. (Série de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou).

25. WORLD HEALTH ORGANIZATION. - Report of scientific working group on plant molluscicide & guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva, 1983. **(TDR/SCH-SWESWE (4)/ 83.3).**

Recebido para publicação em 22/01/1993
Aceito para publicação em 20/07/1993