

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ALEXSANDRA NASCIMENTO DE CARVALHO

**TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO EXTRATO ETÉREO, DA
ATRANORINA E DO ÁCIDO PRAESOREDÍOSICO DE *Parmotrema praesorediosum*
(NYL.) HALE**

Recife
2015

ALEXSANDRA NASCIMENTO DE CARVALHO

**TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO EXTRATO ETÉREO, DA
ATRANORINA E DO ÁCIDO PRAESOREDIÓSSICO DE *Parmotrema praesorediosum*
(NYL.) HALE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins

Recife
2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Carvalho, Alexandra Nascimento de

Toxicidade e atividade moluscicida do extrato etéreo, da atranorina e do ácido praesorediósico de *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale/Alexandra Nascimento de Carvalho. – Recife: O Autor, 2015.

74 f.: il.

Orientador: Nicácio Henrique da Silva, Mônica Cristina Barroso Martins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia 2015.
Inclui referências e anexos

1. Esquistossomose 2. *Biomphalaria glabrata*. Silva, Nicácio Henrique da (orient.) II. Martins, Mônica Cristina Barroso (coorient.) III. Título.

616.963

CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2015-255

Alexsandra Nascimento de Carvalho

Toxicidade e atividade moluscicida do extrato etéreo, da atranorina e do ácido praesorediósico de *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada por:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva - Presidente

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio

Data: 23 / 02 / 2015

Dedico este trabalho aos meus pais que com muito amor e carinho proporcionam a cada dia da minha vida momentos de extrema felicidade, sempre incentivando a nunca desistir dos meus sonhos persistindo sempre na realização destes e buscando sua concretização com amor a Deus e ao próximo, respeito, humildade, sabedoria, dedicação e muito estudo.

“A confiança na Providência divina é a fé firme e viva de que Deus nos pode ajudar e nos ajudará. Que ele nos pode ajudar é evidente, pois ele é onipotente. Que ele nos ajudará, é seguro, porque Ele, em muitas passagens da Sagrada escritura, prometeu e foi fiel a todas as Suas promessas”.

(Beata Madre Teresa)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus e a Nossa Senhora que me deram o dom da vida e que suportada pela fé divina guiam os meus caminhos.

Agradeço aos meus pais Luciana e Alexandre por todo carinho e pela demonstração constante de amor com gestos ou palavras. E esse amor que é recíproco e que me dá motivação para viver a vida intensamente. Vocês são exemplos de determinação, coragem, força, minha fonte de amor e inspiração para nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada Painho e Mainha por tudo que vocês representam na minha vida.

A minha vó, Olindina, por todo amor, carinho, ensinamentos e por toda sua ajuda nesta etapa da minha vida. Voinha, obrigada pelas orações e por me incentivar a cada dia buscar a presença de Deus e de Nossa Senhora na nossa família.

Ao meu esposo João Paulo pelo amor, carinho, companheirismo, pelas palavras de incentivo, paciência e toda sua compreensão em todos os momentos ao longo dessa nossa caminhada.

Ao meu irmão Alexandre Jr., e minha cunhada Tamires e sobrinho Thiago pelo apoio e torcida.

A minha tia Adriana e ao meu primo Marcos pelo amor, carinho, palavras de incentivo e torcida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva agradeço imensamente por todo ensinamento, incentivo e motivação de perseverar nessa caminhada e por muitas vezes ser meu “pai científico”, sempre ao meu lado e disposto a solucionar qualquer problema, mesmo aqueles que pareciam impossíveis. Minha grande inspiração profissional, sua dedicação, humildade e respeito em tudo que realiza o torna muito especial, sou eternamente grata por tudo que o senhor faz por mim.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Monica Martins por sua amizade, carinho, paciência, palavras de consolo, colaboração e por todos os ensinamentos durante essa trajetória acadêmica.

A Profa. Dra. Ana Maria Mendonça pelos ensinamentos, apoio, paciência, confiança, amizade, otimismo e especialmente pelo acolhimento maravilhoso no seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Emerson Peter por acreditar no meu potencial, sempre esteve presente na minha vida acadêmica motivando a realização deste sonho, sempre com palavras de incentivo para não desistir e nos momentos difíceis com palavras de conforto e torcendo para que tudo

desse certo. Um grande bioquímico e exemplo de profissional que me inspira desde a graduação, obrigada meu grande mestre pelos ensinamentos e conselhos.

A Profa. Dra. Eugenia Cristina Pereira por me receber com muito carinho no grupo de Liquenologia, pelos ensinamentos e por toda orientação.

Ao Sr. João Virginio, por todo apoio técnico e científico, pelas palavras de incentivo e por estar sempre ao meu lado, especialmente nos momentos de desespero quando pensei que algo pudesse dar errado, sempre estive a disposição com bastante otimismo e como um anjo salva tudo e todos.

Ao Sr. Fredson, pela atenção, eficiência, pelos ensinamentos especialmente da língua estrangeira, disposição em ajudar quando necessário e pelas boas conversas no final do expediente.

A minha amiga Hianna pelos ensinamentos, extrema paciência, compreensão e companheirismo, pois, independente do dia ou horário estive sempre à disposição. Obrigada amiga pela força, equilíbrio e carinho que foram essenciais ao longo desta jornada.

Aos meus amigos da turma de mestrado, do Laboratório de Química de Produtos Naturais e do Laboratório de Biofísica e Radiobiologia por todos os ensinamentos, apoio e torcida.

E a todos que participaram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença endêmica distribuída em regiões tropicais e subtropicais, que pode ser controlada através do molusco *Biomphalaria glabrata*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades embriotóxicas, moluscicida e artemicida do extrato etéreo, da atranorina e do ácido praesorediósico, ambos purificados de *Parmotrema praesorediosum*. A partir do extrato obtido de *P. praesorediosum* com éter dietílico foram realizados isolamento e purificação do ácido praesorediósico e da atranorina. O extrato etéreo e as substâncias purificadas foram analisadas através de CCD, CLAE, RMN-H¹ e RMN-C¹³. Para a realização dos bioensaios, todas as substâncias analisadas foram dissolvidas em DMSO (0,25%) e expostas por 24 h a 25°C e foram utilizados grupos controle negativos (água e DMSO a 0,25%) e positivos (niclosamida 20 µg/mL e carbonato cúprico 50 µg/mL). Para os ensaios de embriotoxicidade com *B. glabrata* utilizou-se as seguintes concentrações para o extrato etéreo 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, a atranorina 1000, 500 e 250 µg/mL e o ácido praesorediósico 500, 250 e 125 µg/mL. Após a exposição, os embriões foram observados por 8 dias consecutivos e classificados como inviáveis (embriões mortos e malformados) e viáveis (embriões eclodidos). Os experimentos foram realizados em triplicata com 100 embriões por grupo. Para os testes moluscicidas foram selecionados 150 animais, que foram colocados em recipientes individuais com água filtrada para verificar a maturidade sexual e, em seguida foram separados 120 animais sexualmente maduros. Os moluscos (n=5) foram separados e submetidos ao extrato etéreo 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e a atranorina purificada 500, 250 e 125 µg/mL, e os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e avaliados durante 8 dias. Para o ensaio de toxicidade ambiental com *A. salina* utilizou-se o extrato etéreo 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL, a atranorina purificada 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e o ácido praesorediósico purificado 200, 125, 62,5 µg/mL incubados em água do mar. Os testes foram realizados em quadruplicata com 5mL da solução com dez larvas por tubo de ensaio. Os grupos foram analisados quanto à frequência de letalidade e sobrevivência. Os testes estatísticos utilizados foram o ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls com $p < 0,05$. A embriotoxicidade do extrato etéreo e do ácido praesorediósico purificado foram comprovados, pois as substâncias apresentaram valores de CL₅₀ de 363,07 µg/mL e 213,79 µg/mL, respectivamente. A CL₅₀ estimada para os moluscos tratados com o extrato etéreo foi de 102,32 µg/mL demonstrando ser bastante eficiente no combate ao hospedeiro intermediário. A atranorina purificada não apresentou toxicidade sobre embriões e moluscos. Os ensaios demonstraram que o extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico, ambos purificados, apresentaram baixa toxicidade ao microcrustáceo, indicando que estas substâncias oferecem baixo risco ao meio ambiente. A toxicidade do extrato etéreo e do ácido praesorediósico purificado do líquen *P. praesorediosum* nas diferentes concentrações testadas causou significativa letalidade sobre embriões e moluscos de *B. glabrata*, demonstrando ser bastante promissor visto que pode ser considerado como potente agente moluscicida.

Palavras-chave: Embriotoxicidade. *Biomphalaria glabrata*. Letalidade. *Artemia salina*. Substâncias liquênicas.

ABSTRACT

Schistosomiasis is endemic distributed in tropical and subtropical regions, which can be controlled by the snails *Biomphalaria glabrata*. The purpose since work was to evaluate the embryotoxic activities, molluscicide and artemicida ether extract, the atranorin and praesorediosic acid, both of purified *Parmotrema praesorediosum*. From the extract obtained from *P. praesorediosum* with diethyl ether was carried out isolation and purification of praesorediosic acid and atranorin. The ether extract and the purified compounds were analyzed by CCD, HPLC, RMN-H¹ and RMN-C¹³. To achieve the bioassays, all analyzed substances were dissolved in DMSO (0.25%) and exposed for 24 hours at 25°C and used negative control (water and DMSO 0,25%) and positive (niclosamide 20 µg/mL cupric carbonate and 50 µg/mL). For embryotoxicity tests with *B. glabrata* was used for the following concentrations ether extract 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 and 25 µg/mL, the atranorin 1000, 500 and 250 µg/mL and acid praesorediosic 500, 250 and 125 µg/mL. After exposure, the embryos were observed for 8 consecutive days and are classified as non-viable (dead embryos and malformed) and viable (hatched embryos). The experiments were performed in triplicate with 100 embryos per group. To test molluscicides 150 animals were selected, which were placed in individual containers with filtered water to check sexual maturity, and then were separated 120 sexually mature animals. The snails (n= 5) were separated and subjected to ether extract 200, 150, 100, 50 and 25 µg/mL and atranorin purified 500, 250 and 125 µg/mL, and tests were performed in triplicate for each concentration and evaluated for 8 days. For environmental toxicity test with *A. salina* used the ether extract 1000, 500, 250, 100, 50 and 25 µg/mL, the purified atranorin 1000, 500, 250, 125 and 62.5 µg/mL and purified acid praesorediosic 200, 125, 62.5 µg/mL incubated in sea water. The tests were performed in quadruplicate with 5mL of the solution with ten larvae per test tube. The groups were analyzed for frequency and lethality survival. Statistical analyzes were performed using ANOVA and the Newman-Keuls post-test with p<0.05. Embryotoxicity ether extract and the purified acid praesorediosic been proven, as the substances showed CL₅₀ values of 363.07 µg/mL to 213.79 µg/mL, respectively. The CL₅₀ estimated for snails treated with ether extract was 102.32 µg/mL demonstrating to be quite efficient in combating intermediate host. The atranorin purified showed no toxicity to embryos and snails. The tests showed that the ether extract, the atranorin and praesorediosic acid, both purified, showed low toxicity microcrustacean, indicating that these substances offer low risk to the environment. The toxicity of ether extract and the purified acid praesorediosic lichen *P. praesorediosum* in different concentrations tested caused significant mortality of embryos and snails *B. glabrata*, proving to be very promising as it can be considered as potent molluscicidal agent.

Keyword: Toxicity. *Biomphalaria glabrata*. *Artemia salina*. Lichen substances. *Parmotrema praesorediosum*.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1 - Esquistossomose: ciclo de transmissão. 13
- Figura 2 - Distribuição da esquistossomose no Brasil, de acordo com a faixa de prevalência. 15
- Figura 3 - *Parmotrema praesorediosum*. 21

ARTIGO

- Figura 1 - Cromatografia em camada delgada do líquen *Parmotrema praesorediosum*. 1. Ácido praesorediósico purificado; 2. Atranorina purificada; 3. Extrato etéreo; 4. Padrão de atranorina. 46
- Figura 2 - Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etéreo de *P. praesorediosum*. 46
- Figura 3 - Cromatografia líquida de alta eficiência da atranorina purificada a partir do extrato etéreo de *P. praesorediosum*. 47
- Figura 4 - Cromatografia líquida de alta eficiência do ácido praesorediósico purificado a partir do extrato etéreo de *P. praesorediosum*. 47
- Figura 5 - Estrutura química da atranorina purificada. 48
- Figura 6 - Estrutura química do ácido praesorediósico purificado. 48
- Figura 7 - Embriotoxicidade de *B. glabrata* submetidos por 24h ao tratamento com o extrato etéreo, a atranorina purificada e ao ácido praesorediósico purificado do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água filtrada, Ctrl 2 - água filtrada com DMSO a 0,25%, Ctrl 3 - água filtrada com niclosamida a 20 µg/mL). 49

*****p<0,0001** comparado com o grupo Ctrl 1. A: Tratamento com extrato etéreo a 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. B: Tratamento com a atranorina purificada a 1000, 500 e 250 µg/mL e grupos controles. C: Tratamento com o ácido praesorediósico purificado a 500, 250 e 125 µg/mL e grupos controles.

- Figura 8 -** Atividade moluscicida de adultos jovens *B. glabrata* pigmentados submetidos por 24h ao tratamento com o extrato etéreo e a atranorina purificada do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água filtrada, Ctrl 2 - água filtrada com DMSO a 0,25%, Ctrl 3 - água filtrada com niclosamida a 20 µg/mL, Ctrl 4 - água filtrada com carbonato cúprico a 50 µg/mL). A: Tratamento com extrato etéreo a 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. B: Tratamento com a atranorina purificada a 500, 250 e 125 µg/mL e grupos controles. **50**
- Figura 9 -** Toxicidade das larvas de *Artemia salina* submetidas por 24h ao tratamento com o extrato etéreo, a atranorina purificada e ao ácido praesorediósico purificado do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água do mar, Ctrl 2 - água do mar com DMSO a 0,25%). A: Tratamento com extrato etéreo a 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. B: Tratamento com a atranorina purificada a 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e grupos controles. C: Tratamento com o ácido praesorediósico purificado a 200, 125, 62,5 µg/mL e grupos controles. **51**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos gerais sobre esquistossomose	13
1.2 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose	15
1.3 Ecotoxicologia	17
1.4 Líquens	19
1.4.1 <i>Parmotrema praesorediosum</i>	20
REFERÊNCIAS	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 ARTIGO	30
4 CONCLUSÃO	47
ANEXO A – FIGURAS DO ARTIGO	48
ANEXO B – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	54
ANEXO C – GUIDE FOR AUTHORS (PLOS ONE)	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a esquistossomose

A esquistossomíase, bilharziose, esquistossomose mansônica ou intestinal é popularmente conhecida no Brasil por xistossomose, xistosa, doença dos caramujos ou barriga-d'água. É uma doença causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, que tem o ser humano como um dos hospedeiros definitivos e planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, *Bulinus*, *Oncomelania*, como hospedeiros intermediários (REY, 2001). As espécies *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* são os principais agentes etiológicos para o homem.

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos do gênero *Biomphalaria* (REY, 2008). A diversidade do ciclo degenéticos do parasito (Figura 1), apresenta uma fase sexuada que pode ocorrer em mamíferos, inclusive no homem, o principal hospedeiro definitivo, enquanto a evolução do esporocisto para cercária, fase assexuada, se restringe a um número reduzido de caramujos. A infecção provocada pelo *S. mansoni* ocorre por meio da penetração ativa de larvas ciliadas do parasito, os miracídios, em qualquer ponto das partes mole expostas do caramujo (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Figura 1 - Esquistossomose: ciclo de transmissão.



Fonte: CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008.

Essa patologia pode apresentar diferentes formas clínicas, desde assintomática, até formas graves, podendo levar ao óbito (REY, 2008). O aumento do número de casos, associado à severidade das formas clínicas, torna a esquistossomose uma doença de grande relevância enquanto problema de saúde pública (PERNAMBUCO, 2013).

A espécie *B. glabrata* é considerada uma das mais importantes, devido sua importância médico-sanitária como hospedeira intermediária do parasito *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose mansônica (OKAZAKI; ANDRADE; KAWANO, 1996). Os moluscos do gênero *Biomphalaria* preferencialmente habitam coleções de águas paradas ou cursos de pouca velocidade com temperatura entre 20° e 30° C, com pH de 6,8 a 7,8, boa iluminação, ricas em matéria orgânica e microbiota abundante (REY, 2008). São fototrópicos e sua alimentação tem como base algas e folhas (NEVES, 2005).

Os caramujos adultos apresentam um diâmetro de concha que varia de 10 a 40 mm e 5mm a 8mm de largura (BRASIL, 2008). São animais hermafroditas, podendo realizar a autofecundação ou a fecundação cruzada. Por viverem em colônias, esses moluscos optam pela fecundação cruzada, o que propicia uma maior variabilidade genética, realizando a autofecundação em circunstâncias críticas (BRASIL, 2008; CANTINHA, 2008; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; NEVES, 2005). Possuem vida média de aproximadamente um ano, atingindo a maturidade sexual por volta de um mês após a eclosão, quando atingem um diâmetro de concha entre 4-7 mm, com desovas plurióvuladas, grande sensibilidade a poluentes e possuem manutenção laboratorial de baixo custo (MUNZINGER, 1987; NEVES; MELO, 1998; REY, 2001).

Os moluscos *B. glabrata*, devido às suas características biológicas e ambientais, além da ampla distribuição geográfica e interferência sobre a saúde humana, como vetor intermediário da esquistossomose mansônica, tem se apresentado como ótimo modelo experimental, possibilitando a avaliação de efeitos produzidos por agentes físicos e químicos no ambiente, além de viabilizar a padronização de metodologias de controle populacional, ou como bioindicadores e biomarcadores de interferentes ambientais (CANTINHA et al., 2010; ESTEVAM et al. 2006; TALLARICO et al., 2004).

Para o controle da esquistossomose, além do tratamento dos pacientes infectados, é necessário o controle das populações malacológicas como uma forma de redução do risco de transmissão da doença. A substância sintética chamada niclosamida é o moluscicida padrão, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sendo eficiente no controle dos caramujos. No entanto, seu alto custo, sua elevada toxicidade, a baixa especificidade e a

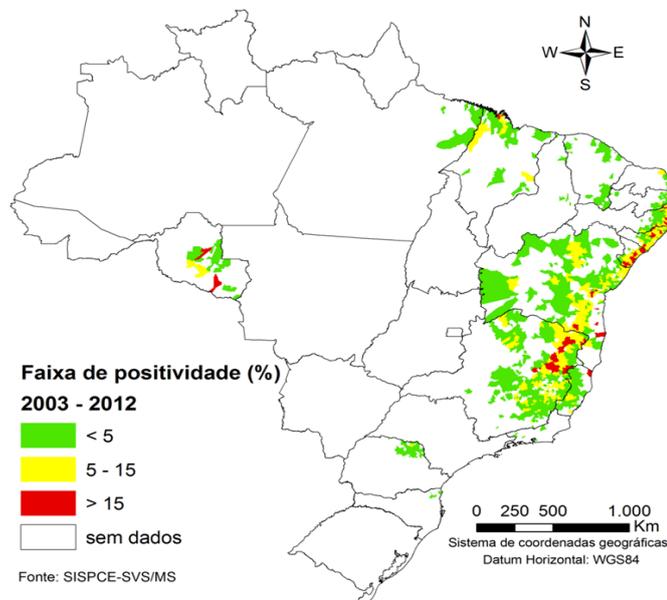
facilidade de decompor-se sob ação da luz solar vêm limitando seu uso nos locais de ocorrência (DELGADO et al., 2002). Desta forma, a busca por moluscicidas naturais (MARTINS et al., 2014) ganhou um novo destaque, visando a obtenção de um produto alternativo mais barato, biodegradável, seguro e disponível na região para controle das populações de caramujos.

1.2 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é endêmica em vasta extensão do território nacional, considerada ainda um grave problema de saúde pública no Brasil porque acomete milhões de pessoas, provocando um número expressivo de formas graves e óbitos (BRASIL, 2014).

Dentre as doenças parasitárias, a esquistossomose apresenta alto índice de prevalência mundial, estimando-se 200 milhões de pessoas atingidas distribuídas em 74 países, em torno de 80% dos casos concentrados na África. No Brasil (figura 2) existem de 8 a 18 milhões de indivíduos infectados, distribuídos em uma faixa endêmica que se estende do Estado do Rio Grande do Norte até Minas Gerais (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008; SALES et al., 2009).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose no Brasil, de acordo com a faixa de prevalência.



Fonte: Brasil, 2012.

O Estado de Pernambuco é considerado a unidade federada do Brasil com maior grau de endemicidade para a esquistossomose e apresenta historicamente uma taxa de mortalidade

cerca de 5 vezes maior que a frequência nacional (PERNAMBUCO, 2013). Na epidemiologia da doença destacam-se as faixas litorâneas e da mata de alguns dos estados nordestinos como Alagoas, Sergipe, Bahia e Pernambuco (RESENDES; SOUZA-SANTOS; BARBOSA 2005). Este último Estado apresenta taxas crescentes de infecção humana, a área endêmica corresponde a 79 (47%) dos 167 municípios do estado. Destes 79 municípios, 73,3% situam-se na Zona Litoral - Mata e 30,4%, no Agreste (BARBOSA; SILVA; BARBOSA, 1996; FAVRE et al., 2001; SILVA, 2011).

Alguns fatores como saneamento, atuam como condicionantes e contribuem para a ocorrência da esquistossomose em determinadas localidades. Destaca-se também o nível socioeconômico, ocupação, grau de educação e informação da população exposta ao risco da doença. Esses fatores se relacionam e favorecem a transmissão da doença, em maior ou menor intensidade, de acordo com a realidade local. Por isso, devido à complexidade do mecanismo de transmissão da esquistossomose e diversidade dos fatores condicionantes, para o controle da doença são necessárias várias ações preventivas. Dentre elas destacam-se o diagnóstico precoce e tratamento, a vigilância e controle dos hospedeiros intermediários e incentivos nas ações educativas em saúde e de saneamento. Neste caso, torna-se necessária a modificação das condições domiciliares e ambientais favoráveis a transmissão da doença, devido a extensa distribuição geográfica da esquistossomose mansoni por si só dimensiona a magnitude desse problema de saúde pública (BRASIL, 2014).

As doenças negligenciadas constituem um grupo de enfermidades associadas à pobreza, para as quais se confere baixo grau de prioridade, tanto nas agendas nacionais quanto na internacional, com baixo investimento em novas tecnologias de diagnóstico e terapêutica. O primeiro relatório sobre a situação destas doenças no mundo (WHO, 2010), inclui 17 patologias ou grupos de doenças na categoria de negligenciadas. Dessas, pelo menos 12 ocorrem de forma endêmica no Brasil sendo algumas consideradas emergentes ou reemergentes no país (dengue, leishmanioses), outras estão em estágio avançado de controle (doença de Chagas, filariose linfática, oncocercose, raiva), uma tem apresentado tendência decrescente (esquistossomose) e outras permanecem em relativa estabilidade (hanseníase, tracoma, cisticercose, hidatidose e geo-helminthíases) (FIOCRUZ, 2012).

A área de doenças negligenciadas tem sido uma prioridade do governo brasileiro, que instituiu o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas, focado em sete doenças: dengue, doenças de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O controle Nacional da esquistossomose foi efetivado em 1975 pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), com a criação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE). Em 1980, o PECE deixou de ser um programa especial da SUCAM e passou a ser denominado Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), implementado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Apesar das mudanças, o PCE manteve as principais características do modelo anterior: levantamento espacial domiciliar, censo da população inicial, diagnóstico coprológico em massa pelo método de Kato-Katz, intensa medicalização com oxamniquine e controle da população de caramujos através do uso de moluscidas (CARDIM, 2010).

Atualmente, a oxamniquine e o praziquantel são os fármacos utilizados para o tratamento das esquistossomoses, apesar de suas limitações, como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda; baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (FREZZA et al., 2009; HOTEZ et al., 2010).

A esquistossomose é uma doença infecciosa e parasitária com tendência ao declínio em sua incidência e prevalência e, recentemente foi incluída no grupo de doenças, prevenível por vacinação (BRASIL, 2014). Há muitos anos a FIOCRUZ estuda uma vacina com foco no combate à esquistossomose. Os pesquisadores isolaram, em 1990, a proteína SM14 obtida do *Schistosoma mansoni*, considerada pela OMS a mais promissora para a criação do primeiro imunizante para a doença no mundo. A fase I dos testes clínicos em seres humanos, iniciada no ano de 2010, dessa vacina foi finalizada mostrando segurança e eficácia de proteção contra a doença (BRASIL, 2010b).

As estratégias atuais para o combate da esquistossomose consistem no controle da transmissão e da morbidade, sendo que possuem limitações, como o elevado custo e o desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas para o tratamento. No entanto, no controle da transmissão da doença por meio do combate ao vetor intermediário é necessário a realização de testes de toxicidade sobre os sistemas biológicos, sendo importante nos estudos envolvendo substâncias potencialmente moluscidas (BRASIL, 2010a).

1.3 Ecotoxicologia

Desde a década de 70 o uso de testes de toxicidade como ferramenta em análises de impacto e monitoramento ambiental vem sendo utilizado, e um grande número de ensaios utilizando organismos marinhos foram realizados no Brasil (RESGALLA JUNIOR;

LAITANO, 2002). O conhecimento sobre a utilização de organismos marinhos em testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos (COSTA et al., 2008). Estas substâncias são aplicadas para avaliar a sensibilidade relativa de uma população de organismos que será utilizada em testes de toxicidade, e também para estimar a precisão e confiabilidade dos dados produzidos em laboratório (ENVIRONMENT CANADA, 1992).

Os ensaios de toxicidade são testes laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, onde os organismos-teste são expostos a diferentes concentrações da amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (COSTA et al., 2008).

A ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos é chamada toxicologia que tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

A toxicologia ambiental se preocupa com o destino dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos de degradação no ambiente, bem como nas cadeias alimentares e com o efeito desses contaminantes sobre os organismos e as populações, além da influência que os agentes tóxicos ambientais exercem sobre a saúde e o bem-estar de humanos, animais e plantas, por meio da interação desses organismos (HODGSON, 2004).

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que centra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes dos ecossistemas (KENDALL et al., 2001; RONCO; BÁEZ; GRANADOS, 2004; STENERSEN, 2004). A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Os ensaios biológicos para a avaliação da toxicidade de substâncias químicas sobre sistemas biológicos baseando-se em organismos aquáticos podem ser realizados através de estudos utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* um invertebrado de água salgada, que apresenta alta sensibilidade a diversos produtos tóxicos, facilidade de cultivo e manutenção em cultura, além de sua importância na cadeia alimentar (MICHELS et al., 1999; PENG; ROBERTS, 2000).

1.4 Líquens

Os líquens são organismos simbióticos formados através da associação do fotobionte (cianobactéria) com o micobionte (fungo) apresentam talos complexos com estruturas morfológicas e anatômicas de importância taxonômica reconhecida, que não estão presentes nos fungos não liquenizados (HILL, 2009). De acordo com as estimativas recentes, os líquens compreendem 18. 500 espécies descritas (MOLNÁR e FARKAS, 2010). No nordeste do Brasil, encontram-se diversas espécies de líquens cujos metabólitos possuem comprovada ação farmacológica (NÓBREGA et al., 2012).

Uma das principais características do ciclo de vida dos líquens é sua capacidade de mudar rapidamente do estado ativo para um estado de inatividade metabólica, quando as condições ambientais estão adversas. Fatores como luminosidade, temperatura, disponibilidade de água, pH e nutrientes controlam a abundância dos líquens (HAUCK, 2011). Estes organismos apresentam como características alta afinidade com o ambiente em que vivem, atuando como indicador ambiental da umidade do ar e pH do seu substrato, além de demonstrar elevada sensibilidade a diversos poluentes, sendo assim ótimos bioindicadores, uma vez que possuem a capacidade de absorver e reter contaminantes atmosféricos, funcionando também como biomonitores (MOTA-FILHO et al., 2007)

A união entre esses simbioses propicia a produção de metabólitos exclusivos deste grupo taxonômico (CULBERSON; CULBERSON; JOHNSON, 1977), as substâncias liquênicas. Estas são responsáveis pela capacidade dos líquens de sobrevivência aos ambientes mais inóspitos. Por isso, são encontrados dos trópicos aos pólos, inclusive em desertos e regiões neotropicais. Além da adaptabilidade dos líquens aos variados ambientes, são encontrados sobre os mais variados tipos de substrato, visto não dependerem destes para sua nutrição. Por isso, habitam rochas, solos, muros, vidros, troncos vivos, ou em decomposição (HALE, 1983; NASH III, 1996; SEAWARD, 1977).

Os compostos liquênicos apresentam uma grande importância econômica, biológica e medicinal, sendo destacados nos sistemas de Ayurveda e Unani onde são usados para tratar várias doenças comuns, inclusive as doenças do sangue, cardíacas, inflamações da asma, bronquite e distúrbios estomacais (MARTINS, 2013; SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

Dentre inúmeras aplicações biotecnológicas dos compostos obtidos de líquens destacam-se as atividades antitumoral (MANOJLOVIC et al., 2010; PAVLOVIC et al., 2013; RUSSO et al., 2012), bactericida (MARTINS et al., 2010), fotoprotetora (KOHLHARDT-

FLOEHR et al., 2010; RABELO et al., 2012) , antiherbívora (SOLHAUG et al., 2009), inseticida (SILVA et al., 2009) e potencial efeito moluscicida (MARTINS et al., 2014).

A pesquisa sobre as substâncias liquênicas começou com os alemães Zopf (1905) e Hesse (1898), entre outros, mas recebeu maior atenção dos japoneses Asahina e Shibata (1954), que iniciaram um estudo onde desenvolveram métodos mais simplificados e específicos de extração. Mais tarde Culberson (1972), bem como Vicente e Legaz (1983) desenvolveram técnicas cromatográficas para separação e identificação dessas substâncias.

As substâncias liquênicas, antes designadas como “ácidos liquênicos”, são na maioria compostos fenólicos, dentre eles os ácidos alifáticos, para e meta depsídeos, depsídonas, benzil ésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenóides, e derivados do ácido pulvínico. No interior do talo, essas substâncias tomam forma cristalina e são extra-celulares, depositados sobre as hifas do micobionte o que confere ao líquen sua capacidade de adaptação às adversidades (CULBERSON, 1970; HALE, 1983; LLANO, 1951; NASH III, 1996; SEAWARD, 1977; VICENTE, 1975).

A produção das substâncias liquênicas ocorre por três principais vias biossintéticas: a do acetato polimalonato, a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico. A partir dessas via são originados os grandes grupos de compostos, onde na primeira são formados os ácidos graxos, depsídeos, depsídonas, quinonas e dibenzofuranos na segunda os pigmentos amarelos, na terceira os terpenóides e esteróides. Mas também são relatadas as vias dos aminoácidos e a dos carboidratos, onde há a biossíntese dos sacarídeos e polióis. Contudo, a maioria dos metabólitos secundários têm origem biossintética via ácido chiquímico e acetato polimalonato, e perfazem cerca de 10% do peso do talo seco (HALE, 1983; NASH III, 1996).

As substâncias liquênicas podem ser de origem medular ou cortical apresentando um local específico no interior do líquen para sua produção. A localização pode ainda restringir-se aos apotécios, sorédios ou himênios. Além dos compostos hidrófobos, são também produzidas substâncias hidrossolúveis como polissacarídeos liquênicos, além de inúmeros produtos encontrados em animais e plantas superiores (CULBERSON, 1970).

1.4.1 *Parmotrema praesorediosum*

O líquen *P. praesorediosum* (Nyl.) Hale (figura 3) tem o talo lobado a sublobado, cinza esverdeado a pardo quando em herbário, de até 20,0 cm de diâmetro, membranáceo a submembranáceo, corticícola, ramulícola ou saxícola; lobos de ramificação irregular, cílios

ausentes, medula branca, sem pigmentações, com o lado de baixo negro, lustroso, de liso a rugoso ou pouco venado as margens normalmente marrom a marrom clara, variando para creme, branca, negra ou variegada quando sob lobos sorediados (MARCELLI; BENATTI, 2010).

Figura 3 - *Parmotrema praesorediosum*



Fonte: SPIELMANN; MARCELLI, 2009.

Esse líquen apresenta distribuição Pantropical sendo encontrado na Oceania, Ásia, África, América do Norte, América Central, Caribe e América do Sul- Brasil: BA, MG, MS, PR, RJ, RS, SC e SP. Para identificação das substâncias de importância taxonômica os testes de coloração utilizados são no córtex superior K+ amarelo, UV- (atranorina), na medula K, C, KC-, P-, UV- (ácidos caperático, protoliquesterínico, praesorediósico, e um outro ácido graxo não identificado situado entre os ácidos praesorediósico e protoliquesterínico na cromatografia em camada delgada, talvez ácido protopraesorediósico). A elucidação para essas dúvidas necessita da análise mais rigorosa do material de *P. praesorediosum* e coleta de mais amostra que compartilhasse as características dos espécimes em questão, para uma comparação das características químicas e morfológicas do talo (MARCELLI; BENATTI, 2010).

Os ácidos alifáticos protopraesorediósicos e praesorediósicos foram isolados a partir do líquen *Parmotrema praesorediosum* (DAVID; ELIX; SAMSUDIN, 1990). Esses compostos também foram detectados em *P. praesorediosum* (VIVEK et al., 2014).

Os metabólitos secundários dos extratos acetato de etila e diclorometano obtidos do talo de *P. praesorediosum* foram ativos contra os microrganismos, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Shigella flexnerii*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Candida albicans*. O extrato com diclorometano também exibiu potencial antibacteriano e antifúngico (BALAJI; HARIHARAN, 2007). Um estudo com o extrato metanólico de *P.*

praesorediosum causou inibição significativa nas bactérias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (KAMBAR, et. al., 2014). No estudo usando nanopartículas de prata sintetizadas com *P. praesorediosum* demonstrou atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas (MIE et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tóquio, 1954.
- BALAJI, P.; HARIHARAN, G. N. *In vitro* antimicrobial activity of *Parmotrema praesorediosum* thallus extracts. **Research Journal of Botany**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2007.
- BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n.6, p. 609-616, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica, diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.– 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de esquistossomose: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**, 2010a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações Hospitalares - SIH do SUS**. Brasília, 2010b. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: 7 dez. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM**. Brasília, 2010c. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: 7 dez. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- CANTANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010.
- CANTINHA, R. S. **Influência da radiação gama de alta taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de *Biomphalaria glabrata***. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares): Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
- CANTINHA, R. S. et al. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Low Radiation**, v. 7, n. 4, p. 245-252, 2010.

CARDIM L. L. **Caracterização das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município Lauro de Freitas, Bahia.** Dissertação de mestrado. Salvador: Universidade federal da Bahia, 2010.

CARVALHO O. S.; COELHO P. M. Z.; LENZI H. L. ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008.

CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

COSTA, C. R., et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CULBERSON, C. F. Supplement to “**Chemical and Botanical Guide to Lichen Products**”. *Bryologist*, p. 177-377, 1970.

CULBERSON, Chicita F. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. **Journal of Chromatography A**, v. 72, n. 1, p. 113-125, 1972.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products. **The American Bryological and Lichenological Society**, Inc. St. Louis. 1977.

DAVID, F.; ELIX, J. A.; SAMSUDIN, M. W. Two new aliphatic acids from the lichen *Parmotrema praesorediosum*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1297-1300, 1990.

DELGADO, V. S. et al. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniqué. **Parasitol. Res.**, v.78, p. 648-654, 2002.

ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. **Report EPS1/RM/ 26-** Canada, 1992.

ESTEVAM, E. C. et al. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutation Research**, v. 611, p. 83-88, 2006.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1966 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.34, n.6, p.569-576, 2001.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, **A saúde no Brasil em 2030: diretrizes para a prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro.** / Fundação Oswaldo Cruz... [et al.]. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2012.

FREZZA T. F. et al. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 209-214, 2009.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

HALE JR., M. E. **The Biology of Lichens**, 3rd ed. London, Edward Arnold. 1983.

HAUCK, M. **Site factors controlling epiphytic lichen abundance in northern forests**. *Flora*, v.206, p. 81-90. 2011.

HESSE, O. Contribuição para o conhecimento dos líquens e seus componentes característicos. I. Mitteilung. *J. Prakt. Chemical*. v. 57, p. 232, 1898.

HILL, D. J. **Asymmetric Co-evolution in the Lichen Symbiosis Caused by a Limited Capacity for Adaptation in the Photobiont**. *Botanical Reviewers*, v 75, p. 326–338. 2009.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**, 3rd ed., New Jersey: John Wiley & Sons cap. 1, 2004.

HOTEZ, P. J. et al. Africa is desperate for praziquantel. **The Lancet**, v. 376, n. 9740, p. 496-498, 2010.

KAMBAR, Y. et al. Antibacterial activity of three *Parmotrema* species against drug resistant uropathogens. **Indian Journal of Novel Drug Delivery**, 2014.

KENDALL, R. J. et al. **Em Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons**; Klaassen, C. D., ed.; 6th ed., MacGraw-Hill: New York, cap. 29, 2001.

KOHLHARDT-FLOEHR, C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biol.** 101, 97–102, 2010.

LLANO, G.A. **Economic Use of Lichens**. *Smithsonian Institute Publ.* 4040: p. 385-422, 1951.

LEVI, P. E. **A textbook of modern toxicology**. Ed. Ernest Hodgson. Vol. 51. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2004.

MANOJLOVIC, N. T. et al. **Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand**. *Biological Research*, v. 43, p. 169-176, 2010.

MARCELLI, M. P.; BENATTI, M. N. Espécies de *Parmotrema* (Parmeliaceae, *Ascomycetes* liquenizados) com ácidos graxos ou atranorina medulares do litoral centro-sul do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 117-129, 2010.

MARTINS, M. C. B. et al. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 115-122. 2010.

MARTINS, M. C. B. **Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens**, Tese (doutorado) – UFPE-CCB, Bioquímica e Fisiologia, p. 206-223, 2013.

MARTINS, M. C. et al. Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PLoS one**, v. 9, n. 11, e111102, 2014.

MIE, R. et al. Synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using the lichen *Parmotrema praesorediosum*. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p.121, 2014.

MICHELS, E. et al. Phototatic behavior of *Daphnia* as a tool in the continuous monitoring of water quality: experiments with a positively phototatic *Daphnia magna* clone. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 401-408, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim informativo Decit**: Departamento de Ciência e Tecnologia, da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos; Departamento de Ciência e Tecnologia; Brasília; 2008. Edição Especial, 2008.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MOTA-FILHO, F. O. et al. Influência de poluentes atmosféricos em Belo jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (SAY), a suitable organism for a biotest. **Environmental Technology Letters**, v. 8, p. 141-148, 1987.

NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, 1996.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. [S.l.]: Editora Atheneu, 2005.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo : Atheneu, 1998.

NÓBREGA, N. A. et al. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 101-107, 2012.

OKAZAKI, K.; ANDRADE JR., H. F.; KAWANO, T. Effect of ⁶⁰Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. **Brasillian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1057-1067, 1996.

PAVLOVIC, V. et al. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. **Food and Chemical Toxicologic**, 51, 160-164, 2013.

PENG, G.; ROBERTS, J. C. Solubility and toxicity of resin acids. **Water Research**, v. 34, n. 10, p. 2779-2785, 2000.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco**

SANAR – 2011 / 2014 / Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2013.

RABELO, T. K. et al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**. 26, 304–314, 2012.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Em Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1, 1995.

RESGALLA JUNIOR, C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 153-163, 2002.

REY L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 930, 2011.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 930p., 2008.

RESENDES, A. P. C.; SOUZA-SANTOS, R.; BARBOSA, C. S. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.5, p. 1392-1401, 2005.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004.

RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 98-102, 2005.

RUSSO, A. et al. Effect of vicinacin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. **Chemico-Biological Interactions**, 195, 1–10, 2012.

SALES D. M. et al. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 277-82, 2009.

SEAWARD, M.R.D. **Lichen Ecology**. Academic Press, Inc. London. 1977.

SILVA T. M. S. et al. Composition and molluscicidal activity of essential oils from stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **Journal Essential Oil Research**, v.19, p. 282-284, 2007.

SILVA, M. D. C. et al. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 334–340. 2009.

SILVA, P. C. V.; Domingues, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 3, p. 327-336, 2011.

SHUKLA, K.; JOSHI, P.G.; RAWAT, M.S.M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Review**. v. 9 p. 303-314. 2010.

SOLHAUG, K. A. et al. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia phydodes*. **Flora**. v. 204, n. 1, p. 40-48, 2009.

SPIELMANN, A. A.; MARCELLI, M. P. *Parmotrema s.l.* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) from Serra Geral slopes in central Rio Grande do Sul State, Brazil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 551-595, 2009.

STENERSEN, J.; Chemical Pesticides - Mode of Action and Toxicology, **CRC Press: Boca Raton**, 2004.

TALLARICO, L. F. et al. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research**, v. 561, p. 139-145, 2004.

VICENTE, C.; ESTRELLA LEGAZ, María. Regulation of Urea Production in *Evernia prunastri*: Effects of L-Arginine Metabolites. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 111, n. 2, p. 123-131, 1983.

VICENTE, C. **Fisiologia de las Substâncias Liquênicas**. Madrid, Alhandra, 1975.

VIVEK, M. N. et al. Antibacterial Activity of Three *Parmotrema* Species from Western Ghats of Karnataka against Clinical Isolates of Burn and Dental Caries. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 132-135, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 172 p. Geneva: WHO, 2010.

ZOPF, Wilhelm. **Zur Kenntniss der Flechtenstoffe**. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 340, n. 3, p. 276-309, 1905.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito moluscicida do extrato etéreo e das substâncias purificadas de *Parmotrema praesorediosum* sobre embriões e moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* e o ensaio de letalidade com as larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico a partir do talo *in natura* do líquen *P. praesorediosum*;
- Isolar, purificar e identificar a atranorina e o ácido praesorediósico a partir do extrato etéreo de *P. praesorediosum*, através de análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN H¹), respectivamente.
- Determinar qual a concentração e a CL₅₀ do extrato etéreo e das substâncias purificadas, que agem como moluscicida e /ou embriotóxica sobre *B. glabrata*.
- Avaliar a toxicidade ambiental por meio do bioensaio com *A. salina*.

3 ARTIGO

TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO LÍQUEN *Parmotrema praesorediosum*



Artigo a ser submetido no periódico *PLOS ONE* Journal Information no formato *Original Research Article* (FI: 3. 534; QUALIS CB II: A2).

TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO LÍQUEN *Parmotrema praesorediosum*(NYL.) HALE

Carvalho, A. N.¹; Martins, M. C. B.²; Melo, A. M. M. A.³; Amâncio, F. F.³; Silva, H. A. M. F.¹; Rodrigues, B. R. M.⁴; Falcão, E. P. S.⁵; Pereira, E. C.²; Silva, N. H.⁶

¹Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE, PE, Brasil; ²Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, UFPE, PE, Brasil; ³Laboratório de Radiobiologia e Biofísica, Departamento de Biofísica, UFPE, PE, Brasil; ⁴Centro de Ciências Biológicas, UFPE, PE, Brasil; ⁵Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, PE, Brasil; ⁶Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica UFPE, PE, Brasil;

*Corresponding author

Profº. Drº. Nicácio Henrique da Silva

Laboratório de Química de Produtos Naturais

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife –PE, Brasil.

Phone: +55 81 2126 8541; Fax: +55 81 2126 8540

e-mail: nicacio_hsilva@hotmail.com

TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO LÍQUEN *Parmotrema praesorediosum* (NYL.) HALE

Carvalho, A. N.¹; Martins, M. C. B.²; Melo, A. M. M. A.³; Amâncio, F. F.³; Silva, H. A. M. F.¹; Rodrigues, B. R. M.⁴; Falcão, E. P, S.⁵; Pereira, E. C.²; Silva, N. H.⁶

¹Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE, PE, Brasil; ²Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, UFPE, PE, Brasil; ³Laboratório de Radiobiologia e Biofísica, Departamento de Biofísica, UFPE, PE, Brasil; ⁴Centro de Ciências Biológicas, UFPE, PE, Brasil; ⁵Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, PE, Brasil; ⁶Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica UFPE, PE, Brasil.

RESUMO:

A esquistossomose é uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais. Uma alternativa para o controle a doença é o combate ao molusco vetor *Biomphalaria glabrata*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e a atividade moluscicida do extrato etéreo, da atranorina e do ácido praesorediósico ambos purificados do líquen *Parmotrema praesorediosum* sobre embriões e moluscos de *B. glabrata* e com o microcrustáceo, *Artemia salina*. Para obtenção do extrato etéreo, o material líquênico foi submetido a sucessivas extrações com agitação mecânica a frio com éter dietílico, posteriormente a partir do extrato etéreo foram realizados o isolamento e a purificação do ácido praesorediósico e da atranorina. O extrato etéreo e as substâncias purificadas foram analisadas quimicamente por cromatografias em camada delgada e líquida de alta eficiência, ressonância magnética nuclear de prótons e carbono treze, em seguida testados biologicamente com embriões e moluscos de *B. glabrata* e larvas de *A. salina*. Foram realizados ensaios de embriotoxicidade nas seguintes concentrações com extrato etéreo 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, atranorina 1000, 500 e 250 µg/mL e o ácido praesorediósico 500, 250 e 125 µg/mL, para o teste moluscicida utilizou-se apenas o extrato etéreo 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e a atranorina 500, 250 e 125 µg/mL e para o bioensaio com os microcrustáceos foi analisada a toxicidade ambiental do extrato etéreo 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL, da atranorina 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e do ácido praesorediósico 200, 125, 62,5 µg/mL, em todos os testes realizados as substâncias foram dissolvidas em DMSO a 0,25% e a exposição foi realizada durante 24 h a 25 °C. De acordo com experimento foram utilizados grupos controle negativos (água e água contendo DMSO a 0,25%) e positivos (niclosamida a 20 µg/mL e carbonato cúprico a 50 µg/mL). A embriotoxicidade do extrato etéreo e do ácido praesorediósico foram comprovados, pois as substâncias apresentaram valores de CL₅₀ de 363,07 µg/mL e 213,79 µg/mL, respectivamente. A CL₅₀ estimada para os moluscos tratados com o extrato etéreo foi de 102,32 µg/mL demonstrando ser bastante eficiente, quando comparado com os grupos controle positivos, no combate ao hospedeiro intermediário. A atranorina não apresentou toxicidade aos embriões e moluscos. Os ensaios demonstraram que extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico não causaram toxicidade ao microcrustáceo, indicando que estas substâncias oferecem baixo risco ao meio ambiente. A toxicidade do extrato etéreo e do ácido praesorediósico causou significativa letalidade sobre embriões e adultos de *B. glabrata* e apresentou baixa toxicidade a *A. salina*.

Palavras-chaves: *Biomphalaria glabrata*. *Artemia salina*. Substâncias líquênicas.

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária causada pelo helminto trematódeo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos do gênero *Biomphalaria* [1]. A infecção provocada pelo *S. mansoni* ocorre por meio da penetração ativa de larvas ciliadas do parasito, os miracídios, em qualquer ponto das partes expostas do caramujo [2].

Dentre as doenças parasitárias, a esquistossomose apresenta alto índice de prevalência mundial constituindo um sério problema de saúde pública. Atualmente é considerada uma doença negligenciada, cujo controle tem sido uma prioridade do governo brasileiro [3]. No Brasil os indivíduos infectados estão distribuídos em uma faixa endêmica que se estende do estado do Rio Grande do Norte até Minas Gerais [4]. O Estado de Pernambuco é considerado a unidade federada do Brasil com maior grau de endemidade para a esquistossomose e apresenta historicamente uma taxa de mortalidade cerca de 5 vezes maior que a frequência nacional [5]. Dentre os vários métodos utilizados visando a redução de casos da doença, apresenta-se como estratégia promissora a eliminação do vetor, através de substâncias dotadas de propriedades moluscicidas, a fim de interromper o ciclo evolutivo do parasito e, conseqüentemente, o aparecimento de novos casos da doença [6].

Apesar da existência de agentes moluscicidas, apenas a niclosamida, substância sintética, é recomendada pela Organização Mundial de Saúde, entretanto, a baixa seletividade, elevada toxicidade, alto custo e resistência dos caramujos vêm limitando seu uso [7]. Nesse contexto, a procura de substâncias biodegradáveis tem aumentado o interesse pelo uso de moluscicidas de origem vegetal, havendo vários relatos na literatura sobre plantas e seus princípios ativos, que foram estudados quanto ao seu potencial moluscicida [8]. Com isso, a procura pelos produtos biodegradáveis, tem aumentado o interesse pelo uso de moluscicidas naturais.

Os líquens apresentam talos com estruturas morfológicas e anatômicas que não estão presentes nos fungos não liquenizados [9]. A união entre esses simbioses propicia a produção de metabólitos exclusivos deste grupo taxonômico [10]. Dentre inúmeras aplicações biotecnológicas dos compostos obtidos de líquens destacam-se as atividades antitumoral [11], bactericida [12], fotoprotetora [13], inseticida [14] e recentemente a atividade moluscicida [15].

A produtividade científica relacionada aos produtos naturais, utilizando compostos bioativos de líquens, sugere a realização de novas pesquisas para investigar e avaliar tais

compostos que possam atuar de forma mais específica e seletiva direcionadas ao combate do hospedeiro intermediário, *Biomphalaria glabrata*, a fim de contribuir com a inovação terapêutica, principalmente na região, onde a doença é endêmica.

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e a atividade moluscicida do extrato etéreo e das substâncias purificadas do líquen *Parmotrema praesorediosum* sobre embriões e moluscos da espécie *B. glabrata* e o ensaio de letalidade com as larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Líquen

O líquen *P. praesorediosum* (Nyl.) Hale foi coletado no Município de Sairé, Estado de Pernambuco, Brasil. Uma exsicata n° 76599 foi depositada no Herbário UFP, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O líquen foi identificado pelas características morfológicas e químicas do talo, pela Dra. M. L. L. Buriel.

2.2. Obtenção do extrato orgânico

Para obtenção do extrato orgânico, 60 g do material liquênico foi limpo, seco e pesado em seguida, foi submetido a sucessivas extrações com agitação mecânica a temperatura ambiente com éter dietílico Merck 600 mL utilizando o sistema de esgotamento. Após filtração para separação do resíduo do material liquênico, o extrato etéreo 535 mg foi evaporado até *secura* em rotaevaporador acoplado a banho Maria à temperatura de 40° C e, em seguida, mantido em dessecador.

2.3. Isolamento e purificação das substâncias liquênicas

Para obtenção do ácido praesorediósico o extrato etéreo foi dissolvido parcialmente em éter dietílico 40 mL e a porção solúvel foi tratada com carbonato de sódio a 10% (7 mL) até pH 9,0. Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico a 20% (100 gotas) até pH 1,0. O precipitado formado foi dissolvido em etanol gelado (10 mL) e deixado em repouso (-4° C) até a formação dos cristais do ácido praesorediósico. A porção insolúvel em éter foi dissolvida em clorofórmio 20 mL e levada a refluxo por 4 h em banho Maria a 40° C, sendo

posteriormente filtrada em funil de fundo poroso G4 tratada com etanol gelado Merck e mantida em repouso (-4° C) até formação dos cristais de atranorina.

2.4. Análises Cromatográficas

2.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato etéreo obtido do talo *in natura* do líquen *P. praesorediosum*, a atranorina, o ácido praesorediósico ambos purificados e o padrão da atranorina foram submetidos à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica gel Merck F₂₅₄₊₃₆₆, utilizando o sistema A para eluição (tolueno/ dioxano/ácido acético 45: 12,5: 2 v/v/v). A revelação do cromatograma foi realizada mediante visualização das bandas sob luz UV curta e longa, 254 e 366nm, respectivamente com posterior vaporização de H₂SO₄ a 10% e aquecimento a 50 °C por 5 minutos [16]. As bandas foram identificadas através da comparação de seus fatores de retenção (R_fs) com o padrão da atranorina, obtido do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFPE e com os dados das substâncias descritas na literatura.

2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os ensaios em CLAE foram realizados em cromatógrafo líquido Agilent série 1200 acoplado a um detector de arranjo de diodo modelo 1260, analisados nos intervalos entre 200 e 400 nm. Foi utilizada uma coluna C18 de fase reserva, usando metanol/água/ácido acético (80:19,5:05, v/v/v) como fase móvel em sistema isocrático. A temperatura da coluna foi fixada em 25 °C e controlada digitalmente pelo equipamento. As amostras analisadas, o extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico ambos purificados, foram diluídas na própria fase móvel a 0,1 mg/mL e filtradas em filtros millipore (diâmetro do poro-0,45µm). Os resultados foram avaliados mediante quantificação da área dos picos e o tempo de retenção em minutos das substâncias na coluna [17].

2.5. Confirmação da estrutura molecular das substâncias líquênicas

Para a confirmação estrutural da molécula da atranorina purificada e do ácido praesorediósico purificado foram obtidos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H¹) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono¹³ (RMN-C¹³), em

espectrofotômetro Varian Unity Plus 300 MHz. A RMN-C¹³ foi realizada a 75 MHz e RMN-H¹ a 300 MHz utilizando DMSO- d₆ com o solvente em tubos de 5 mm à temperatura ambiente (25 °C) no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.6. Bioensaios

2.6.1. Obtenção dos Moluscos

Para realização dos experimentos foram utilizados moluscos adultos jovens da espécie *B. glabrata* pigmentados, naturais de São Lourenço da Mata – PE e mantidos no moluscário do Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE em aquários plásticos, com volume de, aproximadamente, 20 L de água filtrada; pH 7,0 e temperatura de 25° C ± 2 °C. A limpeza dos aquários foi feita uma vez por semana, sendo a alimentação realizada diariamente com alface fresca orgânica, cultivada livre de agrotóxicos [18].

2.6.2. Embriotoxicidade

A coleta das desovas dos moluscos foi realizada por meio de polietileno incolor de aproximadamente 5 x 5 cm, depositados sobre a superfície da água dos aquários por um período de 24 h. Os embriões na fase de blástula da espécie *B. glabrata* pigmentados foram analisados quanto à viabilidade e, em seguida, separados em grupos (n = 100) experimentais, controles negativos (água filtrada e água filtrada contendo DMSO a 0,25%) e controle positivo (solução de niclosamida na concentração de 20 µg/mL) e submetidos a diluições seriadas do extrato etéreo 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, da atranorina purificada 1000, 500 e 250 µg/mL e do ácido praesorediósico purificado 500, 250 e 125 µg/mL dissolvidos em DMSO (0,25%), durante 24 h. Após o período de exposição, os embriões foram lavados com água filtrada e analisados durante 8 dias quanto à viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). Os experimentos foram realizados em triplicata [15].

2.6.3. Seleção dos Moluscos adultos de *B. glabrata* e exposição

Moluscos adultos jovens *B. glabrata* pigmentados que apresentaram diâmetro da concha entre 10 e 14 mm e idade mínima de dois meses foram separados, colocados em recipientes individuais, com volume de 180 mL, e observados por cinco dias consecutivos para a verificação da maturidade sexual, constatada pela produção de desovas com embriões saudáveis [18].

Os moluscos selecionados foram separados em grupos (n = 5) experimentais, controles negativos (água filtrada e água filtraada contendo DMSO a 0,25%) e controles positivos (soluções de carbonato cúprico ou niclosamida nas concentrações de 50 e 20 µg/mL, respectivamente). Os animais foram submetidos a diluições seriadas nas seguintes concentrações do extrato etéreo 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e da atranorina purificada 500, 250 e 125 µg/mL, as substâncias foram dissolvidas em DMSO a 0,25%.

Para proceder às exposições agudas durante 24h, os moluscos foram acondicionados em recipientes plásticos de 30 mL contendo cada solução mencionada anteriormente. Todos os grupos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, umidade e estresse. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após a exposição, os grupos foram transferidos para recipientes contendo 250 mL de água, onde foram observados por até 10 dias. Após a exposição foi observada a mortalidade entre os moluscos adultos.

2.7. Ensaio de toxicidade ambiental

2.7.1. *Artemia salina*

Para o ensaio de toxicidade ambiental os ovos encistados de *A. salina* (50 mg) foram colocados em recipientes com água do mar pH 8, sob luz artificial em 30uC, sob aeração constante e temperatura de 25 °C durante 48 h, até sua eclosão [19]. Em seguida as larvas de *A. salina*, foram separadas em grupos (n = 10) experimentais e controles negativos (água do mar e água do mar contendo DMSO a 0,25%). As larvas foram submetidas por grupo a diluições seriadas do extrato etéreo 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL, da atranorina purificada 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e do ácido praesorediósico purificado 200, 125, 62,5 µg/mL dissolvidos em DMSO (0,25%) incubadas em água do mar, por 24 h a 25 °C. Os testes foram realizados em quadruplicatas e a avaliação da mortalidade e sobrevivência das larvas foi realizada através da análise em microscópio estereoscópico para cada uma das concentrações testadas.

2.7. Análises estatísticas

A análise estatística e desvios-padrão foram realizados utilizando GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software San Diego, CA, EUA). Foram estabelecidas diferenças significativas utilizando a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Newman-Keuls, e $P < 0,05$ foi considerado significativo para ambas as análises. As concentrações letais necessárias para matar 50% (CL_{50}) de larvas *A. salina*, embriões ou adultos de *B. glabrata* foram calculados usando análise probit com um intervalo de confiança de 95%, usando StatPlus1 168 2006 Software (Soft Analyst, Canadá).

3. RESULTADOS

3.1. Análises químicas

3.1.1. Caracterização química do extrato etéreo de *P. praesorediosum*, do ácido praesorediósico e da atranorina, ambos purificados

A análise em CCD do extrato etéreo do talo *in natura* do líquen *P. praesorediosum* evidenciou bandas com Rfs equivalente a atranorina purificada 0,87 e 0,52 compatível com o Rf do ácido praesorediósico purificado (Figura 1). Adicionalmente observaram-se outras cinco bandas no extrato etéreo correspondentes a possíveis compostos fenólicos ainda não identificado com Rfs 0,97; 0,78; 0,68; 0,58; 0,15.

A análise em CLAE do extrato etéreo do talo *in natura* de *P. praesorediosum* apresentou um padrão cromatográfico equivalente ao observado no estudo em CCD, Figura 1 e Figura 2 (A e B), sendo vistos oito picos principais com tempos de retenção (Tr) de 10,5; 11,8; 14,9; 16,6; 20,4; 24,8; 29,5, 32,0, Figura 2 (A e B). A atranorina purificada e o ácido praesorediósico purificado do extrato etéreo apresentaram Tr de 24,8 min, Figura 3 (A e B) e 20,1 min, Figura 4 (A e B), respectivamente, onde os mesmos confirmam com o tempo de retenção dessas substâncias citadas na literatura, sendo o percentual de pureza superior a 98%.

As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1) e Carbono (RMN- C^{13}) confirmaram a estrutura química da atranorina purificada (Figura 5), resultando nos seguintes dados: RMN- H^1 (299 MHz, $CDCl_3$) δH : 2,09 (3H, s, Me-8'), 2,54 (3H, s, Me-9), 2,69 (3H, s, Me-9'), 3,98 (3H, s, 7-COOMe), 6,40 (1H, s, H-5), 6,51 (1H, s, H-5'), 10,36 (1H, s, CHO-8), 11,94 (1H, s, HO-2'), 12,50 (1H, s, HO-2) e 12,55 (1H, s, HO-4); RMN- C^{13} (75 MHz, $CDCl_3$) δC : C-1 (102,8), C-2 (169,0), C-3 (108,5), C-4 (167,4), C-5

(112,8), C-6 (152,4), C-7 (169,6), C-8 (193,8), C-9 (25,5), C-1' (116,7) C-2' (162,8), C-3' (110,2) C-4' (151,9), C-5' (115,9), C-6' (139,8), C-7' (172,1), C-8' (24,0), C-9' (9,3) e C-7'-COOMe (52,3).

Através da análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN-C¹³) é possível elucidar a estrutura química do ácido praesorediósico purificado (Figura 6), resultando nos seguintes dados: RMN-C¹³ (299 MHz, CDCl₃) δC: C-1 (165,0), C-2 (138,0), C-3 (144,8), C-4 (76,9), C-5 (11,1), C-6 (170,0), C-7 (31,5), C-8 (24,4), C-9-C-17 (30,3 ; 30,4), C-18 (29,7), C-19 (25,1), C-20 (35,8), C-21 (177,0).

3.2. Toxicidade do extrato etéreo e das substâncias purificadas do líquen *P.*

praesorediosum sobre embriões e adultos de *B. glabrata* e larvas de *A. salina*

Nos testes com os embriões no estágio de blástula de desenvolvimento utilizando o extrato etéreo de *P. praesorediosum* a 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, os tratamentos foram significativos entre os grupos ($p < 0,0001$; $F = 51,56$ e $R = 0,95$): Ctrl 2 vs Ctrl 3, 300, 500 e 1000 µg/mL; Ctrl 3 vs Ctrl 1, Ctrl 2, 25, 50, 100, 150, 250, 300 e 500 µg/mL com $***p < 0,05$ (Figura 7A). Nos ensaios com os embriões utilizando a atranorina purificada de *P. praesorediosum* a 1000, 500 e 250 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 1943$ e $R = 0,99$), os dados foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs Ctrl 3; Ctrl 3 vs Ctrl 1, Ctrl 2, 250, 500 e 1000 µg/mL com $***p < 0,05$ (Figura 7B). Para o tratamento com embriões usando o ácido praesorediósico purificado de *P. praesorediosum* a 500, 250 e 125 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 117,6$ e $R = 0,98$) os resultados foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs Ctrl 3, 250 e 500 µg/mL; Ctrl 3 vs Ctrl 1, Ctrl 2 e 125 µg/mL com $***p < 0,05$ (Figura 7 C).

Nos bioensaios com moluscos adultos jovens de *B. glabrata* pigmentados, os animais foram submetidos ao extrato etéreo a 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, comparado-os com os grupos controles ($p < 0,0001$; $F = 31,58$ e $R = 0,93$). A taxa de mortalidade foi de 100,00% em 200 µg/mL (Figura 8A). E os tratamentos foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs Ctrl 3, Ctrl 4, 200, 150 e 100 µg/mL e os Ctrl 3 e 4 vs Ctrl 1, Ctrl 2, 100, 50, 25 µg/mL (Figura 8A). Os moluscos adultos também foram submetidos a atranorina purificada a 500, 250 e 125 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 80,17$ e $R = 0,97$) (Figura 8B) e os resultados foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs Ctrl 3 e Ctrl 4; Ctrl 3 e 4 vs Ctrl 1, Ctrl 2, 500, 250 e 125 µg/mL com $***p < 0,05$. (Figura 8B).

Nos ensaios de toxicidade ambiental com *A. salina* as larvas foram submetidas por grupo a diluições seriadas do extrato etéreo a 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL, e

comparado com os grupos controles ($p < 0,0001$; $F = 28,47$ e $R = 0,89$) (Figura 9A). Os dados foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9A). As larvas do microcrustáceo também foram submetidas a diluições seriadas da atranorina purificada a 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, comparado-as com os grupos controles ($p < 0,0001$; $F = 144,6$ e $R = 0,97$) (Figura 9B), os tratamentos foram significativos entre os grupos: Ctrl 2 vs 62,5, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ com $***p < 0,05$ (Figura 9B). E as larvas de *A. salina* também foram submetidas ao ácido praesorediósico purificado a 200, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,2837$; $F = 1,39$ e $R = 0,27$), não apresentando diferenças significativas entre os grupos (Figura 9C).

Para análise da concentração letal média, ou seja, a concentração da amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste foi determinada a concentração letal (CL_{50}) nos diferentes ensaios biológicos realizados.

A CL_{50} foi de 363,07 $\mu\text{g/mL}$ e 213,79 $\mu\text{g/mL}$ para os embriões expostos ao extrato etéreo e ao ácido praesorediósico purificado, respectivamente. Como também, a CL_{50} estimada para os moluscos adultos tratados com o extrato etéreo foi de 102,32 $\mu\text{g/mL}$ o que potencializa sua ação moluscicida tornando-o bastante promissor. Nos ensaios de toxicidade utilizando atranorina purificada a taxa de mortalidade máxima dos grupos experimentais foi de 4,7% e 13% para embriões e moluscos adultos, respectivamente, impossibilitando a determinação da CL_{50} . E para os testes de toxicidade ambiental utilizando as larvas de *Artemia salina* a CL_{50} foi de 204,17 $\mu\text{g/mL}$ e 131,82 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etéreo e a atranorina purificada, respectivamente. Entretanto nos ensaios com os microcrustáceos utilizando o ácido praesorediósico purificado não foi possível determinar a CL_{50} , pois a taxa de sobrevivência das larvas foi de 92,5% a 100% apresentando, portanto, baixa toxicidade a substância testada.

4. DISCUSSÃO

A utilização do extrato etéreo, da atranorina purificada e do ácido praesorediósico purificado do líquen *P. praesorediosum* é um estudo pioneiro, visto que na literatura não existe nenhum relato descrevendo estas atividades como moluscicida, embriotóxica e ensaios de toxicidade ambiental com esses compostos. Recentemente foi descrita atividade moluscicida do usnato de potássio produzido a partir do ácido úsnico isolado e purificado do extrato etéreo do líquen *Cladonia substellata* relatando que taxa de mortalidade em embriões e adultos de *B. glabrata* foi maior do que a relatada para o extrato de plantas, visto que os

ensaios com usnato de potássio apresentaram CL_{50} de 5,77 $\mu\text{g/mL}$ e 0,92 $\mu\text{g/mL}$ para embriões e adultos, respectivamente [15].

Outro estudo utilizando substâncias liquênicas no controle da esquistossomose foi realizado analisando a atividade anti-Schistosoma do polissacarídeo sulfatado, onde avaliou a α -D-glucana (Glu.SO4) extraído de *Ramalina celastri* após encapsulação em lipossomas (Glu.SO4-LIPO) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. O efeito do tratamento com Glu.SO4 e Glu.SO4-LIPO (10 mg/kg) sobre a eliminação de ovos, carga parasitária e formação de granulomas hepática foi avaliado e a análise parasitológica revelou que Glu.SO4-LIPO foi tão eficiente quanto Glu.SO4 na redução do ovo e eliminação e carga parasitária [20].

A taxa de mortalidade dos moluscos adultos de *B. glabrata* expostos ao extrato etéreo do líquen *P. praesorediosum* foi consideravelmente alta, visto que apresentou o valor da CL_{50} 102,32 $\mu\text{g/mL}$. Esse dado é bastante relevante quando comparado ao estudo realizado com extratos de organismos marinhos, onde a fração apolar (CH_2Cl_2 - cloreto de metileno) do extrato da alga *Liagora farinosa* e a fração aquosa da esponja *Amphimedon viridis* exibiu atividade moluscicida contra *B. glabrata*. Sendo o extrato CH_2Cl_2 de *L. farinosa* ativo em adultos e embriões de *B. glabrata* apresentando em caramujos adultos valores de CL_{50} de 120 $\mu\text{g/mL}$ [21].

O agente moluscicida recomendado pela Organização Mundial da Saúde é o niclosamida sendo bastante eficaz em todas as fases do ciclo de vida, como observado nesse estudo utilizando o extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico ambos purificados nos testes realizados com embriões e adultos de *B. glabrata* onde a taxa de mortalidade foi de 100% na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Um resultado semelhante foi observado com a utilização do niclosamida a uma concentração menor que 1,5 mg/mL após 2 h de exposição apresentando também uma taxa de mortalidade de 100% [22 e 23]. O estudo com o usnato de potássio demonstrou ser eficaz contra o molusco quando comparado com a niclosamida, visto que em ambos foram observados uma mortalidade de 100% a 1 $\mu\text{g/mL}$ [15].

Nos estudos com a semente moída de *Moringa oleifera* (ESSMol) avaliou à sua atividade moluscicida contra os moluscos *B. glabrata*. Os resultados mostraram que o ESSMol foi eficaz como moluscicida para *B. glabrata* apresentando CL_{50} de 0,419 g/L e CL_{90} de 1,021 g/L. E seu efeito tóxico apresentado nos testes ecotoxicológicos com organismos não alvo ocorreu em concentrações que permitem a manutenção de populações naturais [18].

Nos testes descritos com *A. salina* a CL_{50} foi de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o usnato de potássio [15], e nos ensaios de toxicidade ambiental do presente estudo utilizando as larvas de *A. salina* a CL_{50} apresentou valores de 204,17 $\mu\text{g/mL}$ e 131,82 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etéreo e a atranorina purificada, respectivamente, o que demonstra que as substâncias liquênicas são ecologicamente menos agressivas ao ambiente em relação aos moluscicidas sintéticos e possivelmente mais seguras para manipulação e utilização do homem. Além da toxicidade da niclosamida a organismos aquáticos como peixes, insetos e outros moluscos, a sensibilidade à luz solar e o alto custo, bem como o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essa substância, limita seu uso tornando preocupante sua utilização para o controle da doença [23, 24 e 25].

Os testes realizados com *A. salina* foram importantes para determinar a toxicidade ambiental do extrato etéreo, da atranorina purificada e do ácido praesorediósico purificado do líquen *P. praesorediosum*. Este microcrustáceo que é altamente sensível a diversas substâncias, o que justifica sua utilização determinando seu uso como um modelo experimental para avaliação da toxicidade [8]. Os ensaios demonstraram que extrato etéreo, atranorina e o ácido praesorediósico ambos purificados não apresentaram toxicidade na concentração moluscicida, indicando que estas substâncias oferecem baixo risco para os organismos aquáticos não alvo. Estes resultados foram semelhantes aqueles obtidos nos ensaios com *A. salina* que indicaram uma baixa toxicidade do extrato etéreo testado e das substâncias purificadas, uma vez que todos apresentaram $CL_{50} > 1000$ ppm [26]. Por outro lado, essa 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 [27].

As normas para os testes moluscicidas preconizada pela Organização Mundial de Saúde [28] recomenda a utilização de plantas e produtos vegetais que possam ser utilizados sem afetar o equilíbrio do meio ambiente. A metodologia considera que o extrato pode ser classificado como inativo (0 a 30% de mortalidade) parcialmente ativo (40 a 60% de mortalidade) e ativo (70 a 100% de mortalidade) aos caramujos. Todavia, de acordo com a publicação de 1983 [29], uma substância moluscicida pode ser considerada ativa quando obtiver 90% de mortalidade nas concentrações de 20 ppm para extratos e 100 ppm para substância pura [8].

O estudo com o extrato etéreo e o ácido praesorediósico purificado do líquen *P. praesorediosum* demonstrou ser bastante promissor visto que pode ser considerado como potente agente moluscicida e uma alternativa aos moluscicidas sintéticos, pois apresenta valores de CL_{50} consideráveis sendo eficientes no combate ao molusco nas diferentes fases do seu ciclo de vida.

Portanto a análise do potencial biológico do líquen *P. praesorediosum* foi bastante eficaz, pois, através da relação do homem com os produtos naturais e sua utilização no ecossistema (aquático e terrestre), permite avaliar tais interações que compõe uma cadeia ambiental, a qual fornece fundamentos que podem fortalecer os processos ecológicos que ocorrem entre esses elementos da cadeia envolvendo mais que apenas a ação sobre o ciclo de transmissão da esquistossomose [30 e 31]. Dessa forma, destaca-se a importância de estudar novas substâncias de origem natural que possam atuar de forma mais específica e seletiva direcionadas ao combate do hospedeiro intermediário, o *B. glabrata*, e como estes estudos podem ser maximizados através do uso de uma estratégia integrada ao uso dos metabólicos liquênicos.

AGRADECIMENTOS

A agência brasileira de fomento Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), a Pró-Reitoria para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, aos Departamentos de Bioquímica, Fisiologia, Biofísica e Radiobiologia e de Química Fundamental e a instituição promotora Universidade Federal de Pernambuco que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 930p., 2008.
- [2] Carvalho O. S., Coelho P. M. Z., Lenzi H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008.
- [3] Santos, F. L. A. D., et. al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.
- [4] Sales DM, Santos JEM, Shigueoka DC, et al. Correlação interobservador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. Radiol Bras, 42(4):277-82, 2009.
- [5] Pernambuco. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco SANAR – 2011 / 2014 / Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2013.
- [6] Rey, L. Parasitologia. 4ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 930p., 2011.
- [7] Rocha, T. J. M., Do Nascimento Filho, B. P., Da Rocha Noé, B. D., Júnior, C. P. V., Costa, G. N., Aragão, M. B., & Dos Santos, A. F. Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). Revista de Patologia Tropical, v. 42, n. 2, 2013.
- [8] Cantanhede, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010.
- [9] Hill. D, J. Asymmetric Co-evolution in the Lichen Symbiosis Caused by a Limited Capacity for Adaptation in the Photobiont. Botanical Reviewers, v 75, p. 326–338. 2009.
- [10] Culberson, C. F.; Culberson, W. L., Johnson, A. Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products. The American Bryological and Lichenological Society, Inc. St. Louis. 1977.
- [11] Pavlovic, V., Stojanovic, I., Jadranin, M., Vajs, V., Djordjevic, I., Smelcerovic, A., Stojanovic, G., Effect of four lichen acids isolated from Hypogymnia physodes on viability of rat thymocytes. Food Chem. Toxicol. 51, 160-164, 2013.
- [12] Martins, M. C. B.; Lima, M. J.G.; Silva, F. P.; Azevedo-Ximenes, E.; Silva, N. H., Pereira, E. C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 53, p. 115-122. 2010.
- [13] Rabelo, T.K., et al., Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). Toxicol. in Vitro. 26, 304–314, 2012.

- [14] Silva, M. D. C.; Sá, R.; Napoleão, T. H.; Gomes, F. S.; Santos, N. D. L.; Albuquerque, A. C.; Xavier, H. S.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 63, p. 334–340. 2009.
- [15] Martins, M. C., Silva, M. C., Silva, L. R., Lima, V. L., Pereira, E. C., Falcão, E. P., Melo, A. M. M. A. e Silva, N. H. Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PloS one*, v. 9, n. 11, p. e111102, 2014.
- [16] Culberson, C F. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography A*, v. 72, n. 1, p. 113-125, 1972.
- [17] Legaz, M. E.; Vicente, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnastri* thallus. *Plant Physiology*. v. 71, p. 300-302, 1983.
- [18] Silva, L. R., Silva, E. B., Amaral, A. J., Amancio, F. F., Melo, A. M. M. D. A. et. al. Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama. *Scientia Plena*, v. 9, n. 5, p. 1 – 9, 2013.
- [19] CETESB.1987. Água do mar - Teste de toxicidade aguda com *Artemia* L5.021.
- [20] Araújo, R. V. S. et al. Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 4, p. 311-318, 2011.
- [21] Miyasato, P. A. et al. Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). *Parasitology research*, v. 110, n. 5, p. 1873-1879, 2012.
- [22] Oliveira-Filho Ec, Geraldino Br, Coelho Dr, De-Carvalho Rr, Paumgertten Fjr (2010) Comparative toxicity of *Euphorbia milii* látex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81: 218–227.
- [23] Ribeiro Kal, Carvalho Cm, Molina Mt, Lima Ep, Lopes-Monteiro E, et al. (2009) Activities of naphthoquinonas against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 111: 44–50.
- [24] Ruiz, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev Bras Farmacogn*, v. 15, p. 98-102, 2005.
- [25] Oliveira-Brett AM, Goulart MOF, De Abreu FC. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. *Biosens Bioelectron* 2002;17:913–915.
- [26] Mclaughlin, J.L., Saizarbitori, T.C. & Anderson, J.E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana Química*, 18: 13-18, 1995.

- [27] 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.
- [28] World Health Organization 1965. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. *Bull World Health Organ* 33: 567-576.
- [29] World Health Organization 1983. *Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides*. Geneva: TDR/SC 4-SWE (4)/83.3.
- [30] Turner RK, Daily GC. The Ecosystem Services Framework and Natural Capital Conservation *Environ Res Econ* 2008;39:25-35.
- [31] Daly HE, Farley J. *Ecological Economics: principles and applications*. Island Press, Washington, DC, 2004.
- [32] Asahina, Y.; Shibata, S. *Chemistry of Lichen Substances*. Japan Society from the Promotion of Science. Tokyo, p. 240. 1954.
- [33] David, F.; Elix, J. A.; Binsamsudin, M. W. Two new aliphatic acids from the lichen *Parmotrema praesorediosum*. *Australian Journal of Chemistry*, v. 43, n. 7, p. 1297-1300, 1990.
- [34] Honda, N. K.; Vilegas, W. *Brasil*, 21, 110–124 (1998), “A química dos líquenes”.
- [35] Huneck, S; Yoshimura, I. *Identification of lichen substances*. Springer Berlin Heidelberg, 1996

4 CONCLUSÃO

- O uso do talo da *Parmotrema praesorediosum* tornou possível a obtenção da atranorina purificada e do ácido praesorediósico purificado, obtidos por meio de técnicas de extração por esgotamento a frio.
- As análises por meio de cromatografias em camada delgada e líquida de alta eficiência, Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Carbono Treze, permitiram a identificação qualitativa e quantitativa das substâncias liquênicas.
- A embriotoxicidade do extrato etéreo e do ácido praesorediósico purificado foram comprovados, pois as substâncias apresentaram valores de CL_{50} de 363,07 $\mu\text{g/mL}$ e 213,79 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
- A CL_{50} estimada para os moluscos adultos tratados com o extrato etéreo foi de 102,32 $\mu\text{g/mL}$ demonstrando ser bastante eficiente no combate ao hospedeiro intermediário podendo ser considerado uma das formas de redução do risco de transmissão da esquistossomose.
- A atranorina purificada não apresentou toxicidade aos embriões na fase de blástula nem aos moluscos adultos jovens da espécie *B. glabrata*.
- Os ensaios demonstraram que extrato etéreo, a atranorina e o ácido praesorediósico ambos purificados não causaram toxicidade as larvas do microcrustáceo *A. salina*, indicando que estas substâncias oferecem baixo risco ao meio ambiente.

ANEXO A – FIGURAS DO ARTIGO

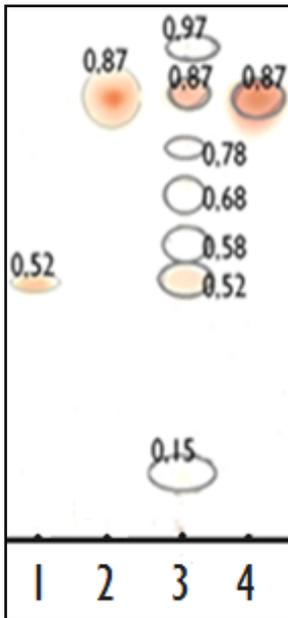


Figura 1 - Cromatografia em camada delgada do líquen *Parmotrema praesorediosum*. 1. Ácido praesorediósico purificado; 2. Atranorina purificada; 3. Extrato etéreo; 4. Padrão de atranorina.

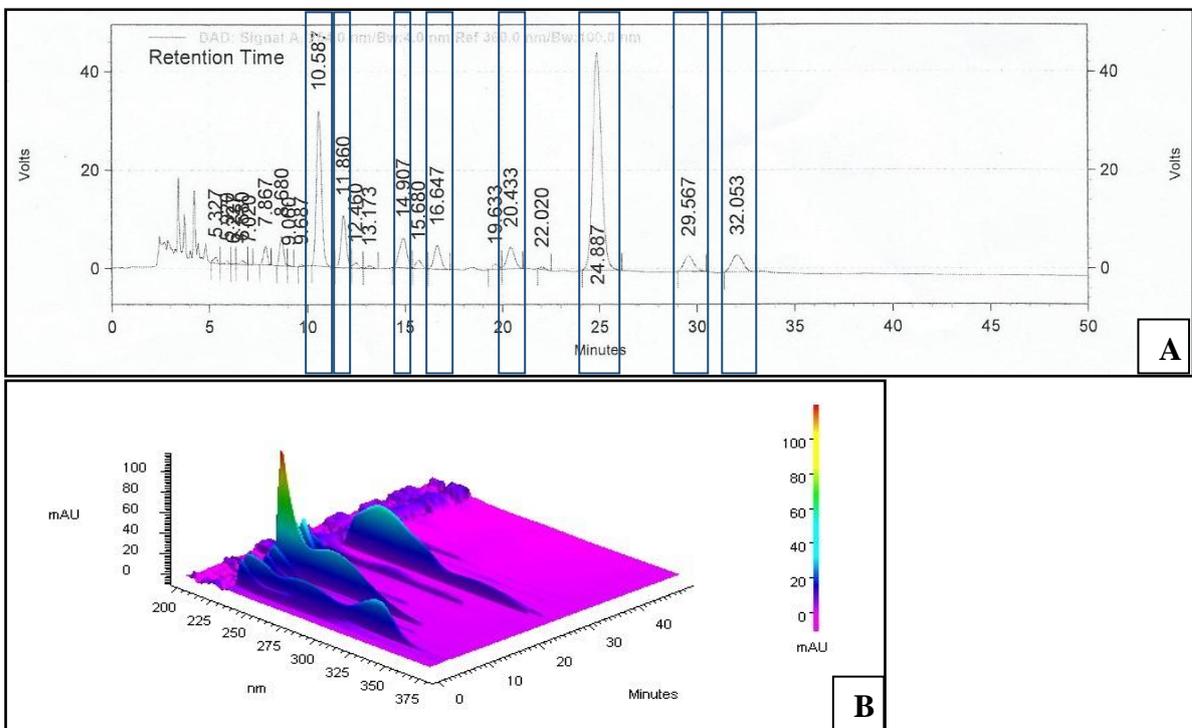


Figura 2 - Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etéreo de *P. praesorediosum*

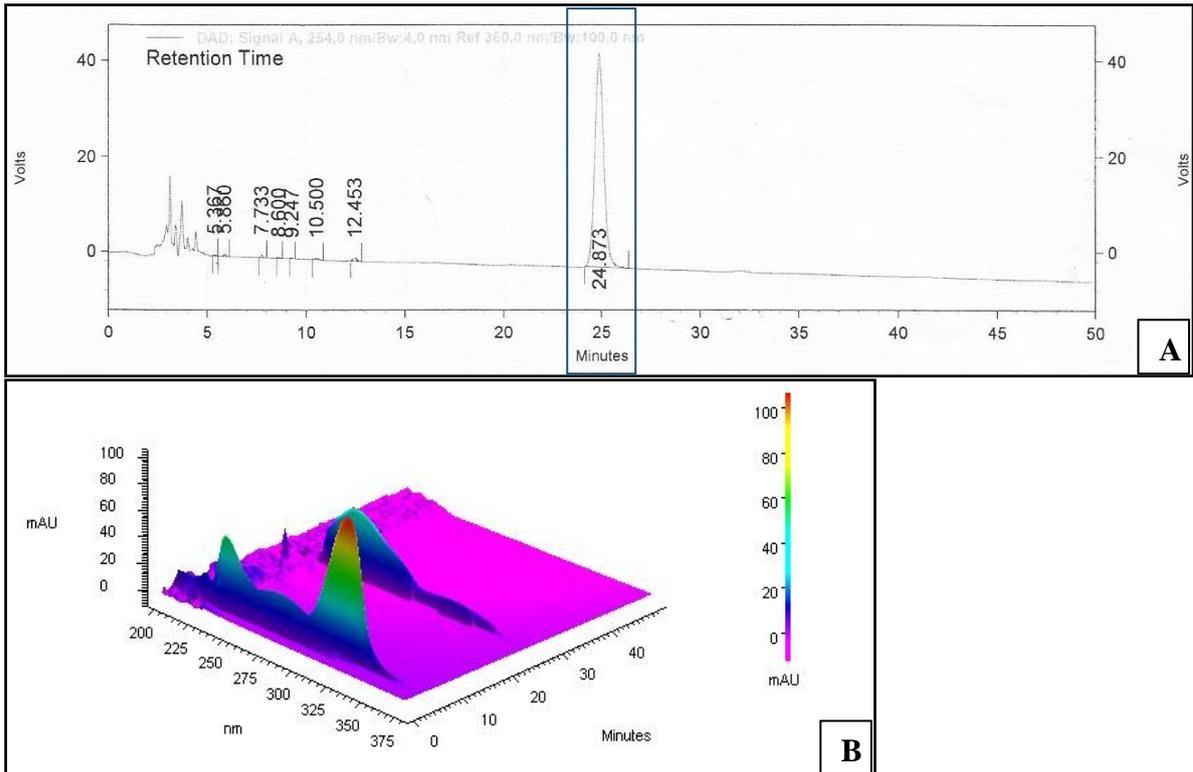


Figura 3 - Cromatografia líquida de alta eficiência da atranorina purificada a partir do extrato etéreo de *P. praesorediosum*

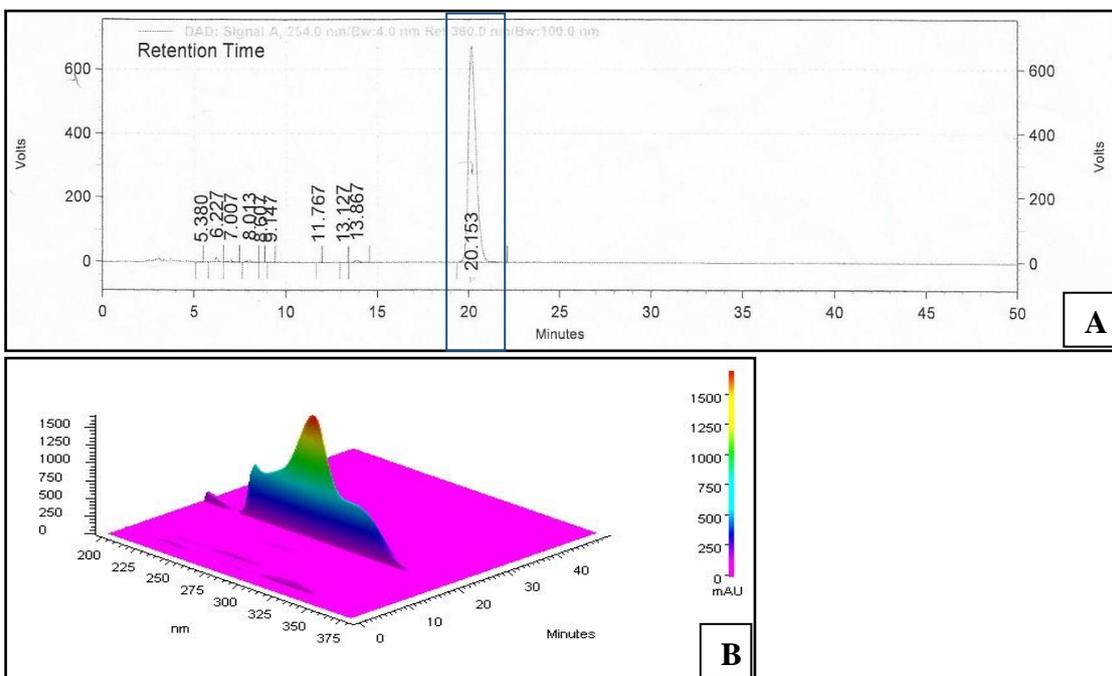


Figura 4 - Cromatografia líquida de alta eficiência do ácido praesorediósico purificado a partir do extrato etéreo de *P. praesorediosum*

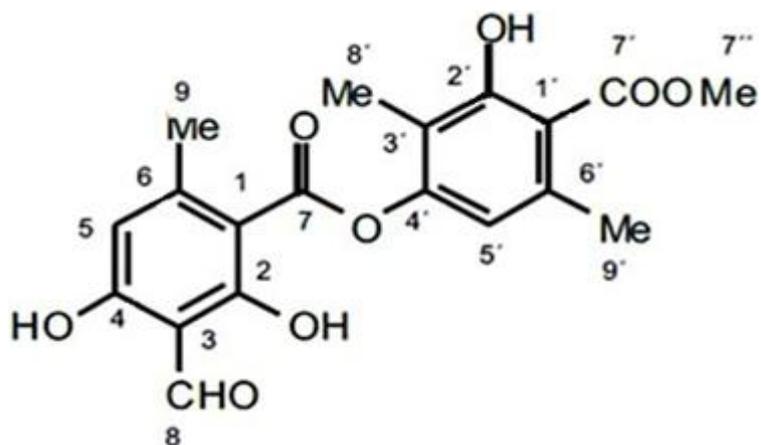


Figura 5 - Estrutura química da atranorina purificada. Fonte: Honda e Vilegas, 1998.

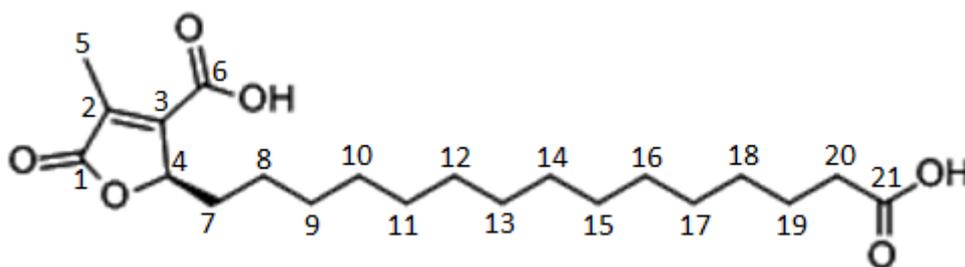


Figura 6 - Estrutura química do ácido praesorediósico purificado (David, Elix e Bin Samsudin, 1990). Fonte: Huneck e Yoshimura, 1996.

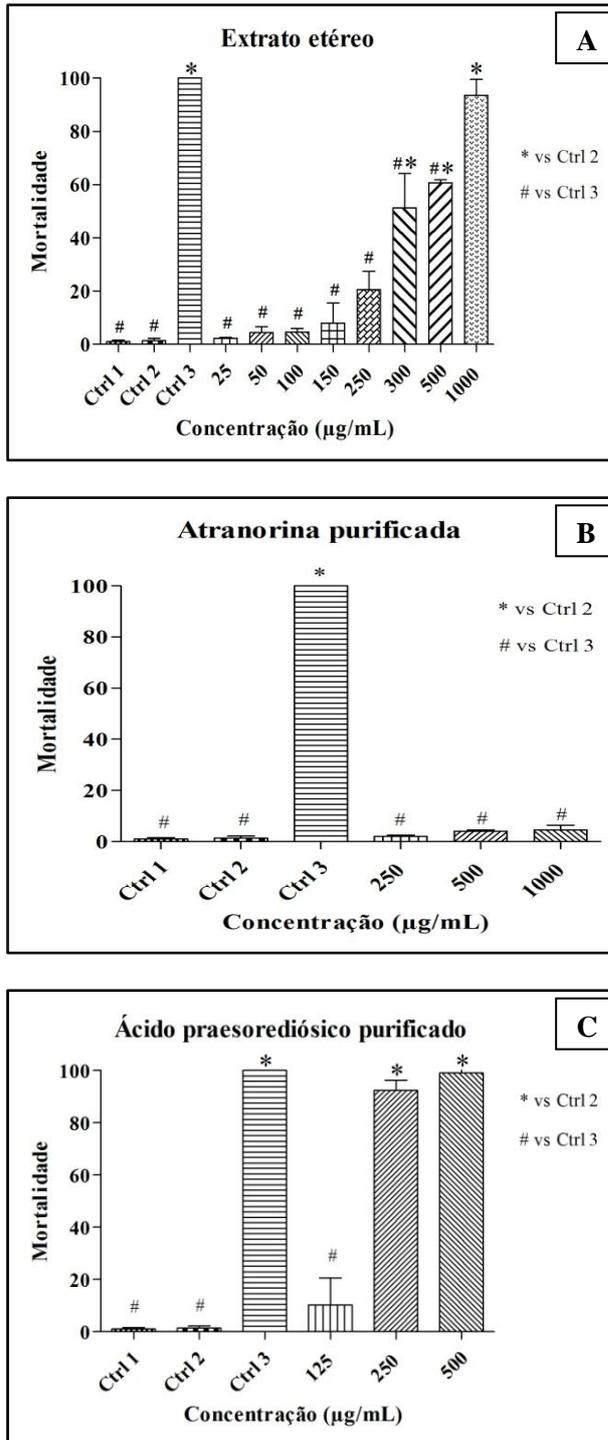


Figura 7 - Embriotoxicidade de *B. glabrata* submetidos por 24h ao tratamento com o extrato etéreo, a atranorina purificada e ao ácido praesorediosico purificado do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água filtrada, Ctrl 2 - água filtrada com DMSO a 0,25%, Ctrl 3 - água filtrada com niclosamida a 20 µg/mL). *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo Ctrl 1. **A:** Tratamento com extrato etéreo a 1000, 500, 300, 250, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. **B:** Tratamento com a atranorina purificada a 1000, 500 e 250 µg/mL e grupos controles. **C:** Tratamento com o ácido praesorediosico purificado a 500, 250 e 125 µg/mL e grupos controles.

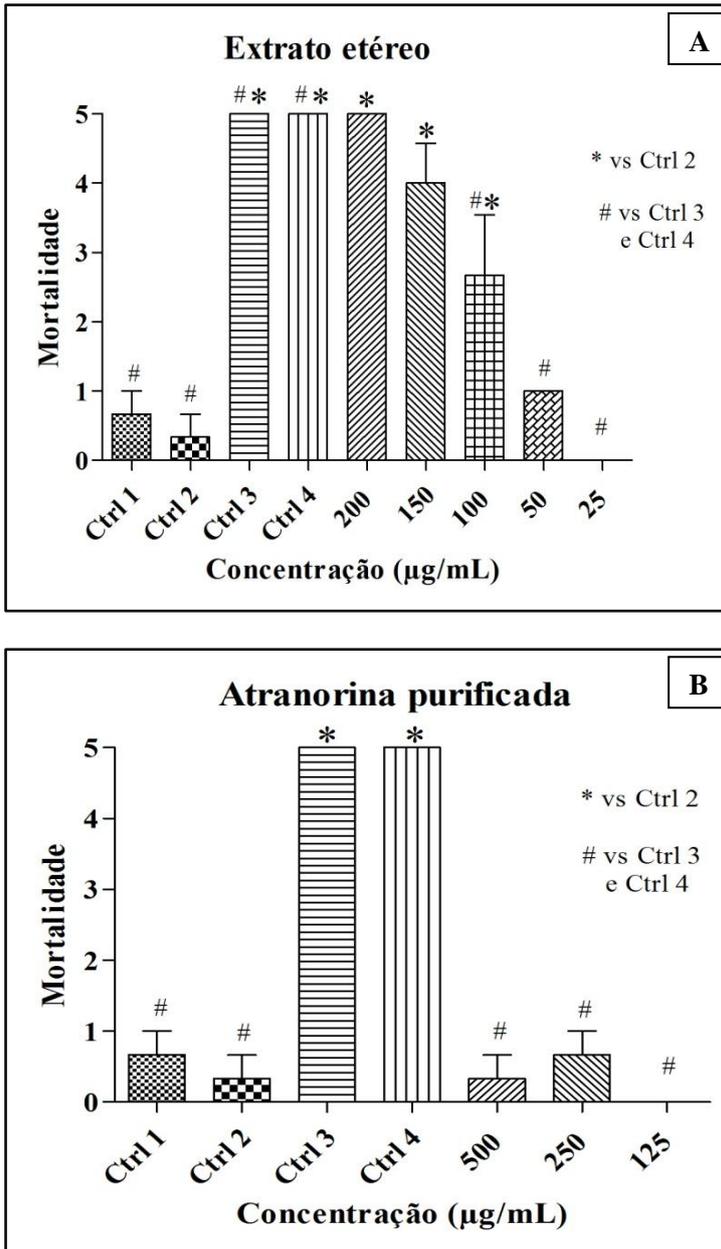


Figura 8 - Atividade moluscicida de adultos jovens *B. glabrata* pigmentados submetidos por 24h ao tratamento com o extrato etéreo e a atranorina purificada do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água filtrada, Ctrl 2 - água filtrada com DMSO a 0,25%, Ctrl 3 - água filtrada com niclosamida a 20 µg/mL, Ctrl 4 - água filtrada com carbonato cúprico a 50 µg/mL). **A:** Tratamento com extrato etéreo a 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. **B:** Tratamento com a atranorina purificada a 500, 250 e 125 µg/mL e grupos controles.

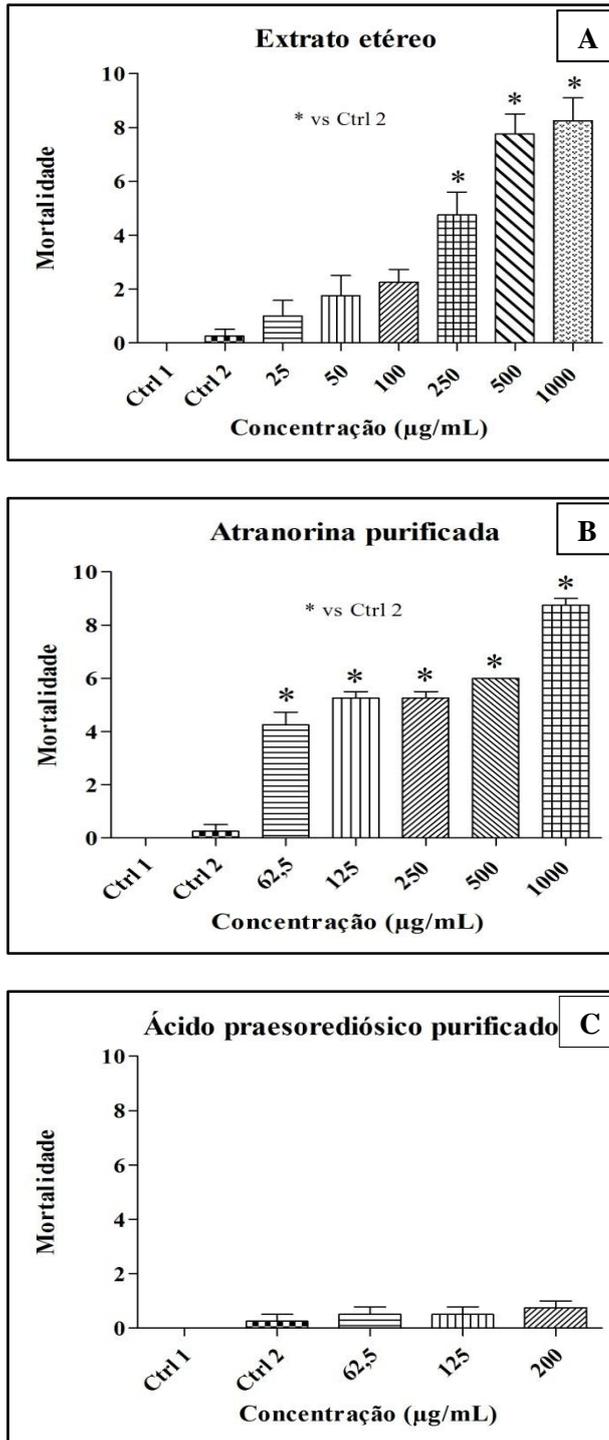


Figura 9 - Toxicidade das larvas de *Artemia salina* submetidas por 24h ao tratamento com o extrato etéreo, a atranorina purificada e ao ácido praesorediósico purificado do líquen *Parmotrema praesorediosum* em diferentes concentrações e grupos controles (Ctrl 1 - água do mar, Ctrl 2 - água do mar com DMSO a 0,25%). **A:** Tratamento com extrato etéreo a 1000, 500, 250, 100, 50 e 25 µg/mL e grupos controles. **B:** Tratamento com a atranorina purificada a 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL e grupos controles. **C:** Tratamento com o ácido praesorediósico purificado a 200, 125, 62,5 µg/mL e grupos controles.

ANEXO B – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Botânica

Herbário UFP – Geraldo Mariz

Nº: 76.599

Fam.: Parmeliaceae

Sp.: *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale

Nome vulgar:

Col.: Maria de Lourdes Lacerda Buriel, 13-II-2014.

Det.: Maria de Lourdes Lacerda Buriel 13/II/2014.

Proc.: Brasil, Pernambuco, município de Sairé, Sítio Prodígio,
caatinga, sobre rocha.

Obs.: Líquen folhoso

ANEXO C – GUIDE FOR AUTHORS (PLOS ONE)*PLOS ONE* Manuscript Guidelines

1. Format Requirements
2. Guidelines for Standard Sections
 - Title
 - Authors and Affiliations
 - Abstract
 - Introduction
 - Materials and Methods
 - Results, Discussion, and Conclusions
 - Acknowledgments
 - References
 - Figure Legends
 - Supporting Information Captions
 - Data Reporting Guidelines
 - Accession Numbers
 - Striking Images
 - Tables
3. Specific Reporting Guidelines
 - Human Subject Research
 - Clinical Trials
 - Animal Research
 - Observational and Field Studies
 - Cell Line Research
 - Blots and Gels
 - Antibodies
 - Systematic Review/Meta-Analysis
 - Paleontology and Archaeology Research
 - Software Papers
 - Database Papers
 - New Zoological Taxon
 - New Botanical Taxon
 - New Fungal Taxon
 - Qualitative Research

1. Format Requirements

PLOS ONE does **not** consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the [Figure and Table Guidelines](#))
Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are **not** copyedited before publication.

In addition to the guidelines below, please refer to our downloadable sample files to make sure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download full manuscript sample \(PDF\)](#)
Submissions that do not meet the [PLOS ONE Publication Criterion for language standards](#) may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature
 - Briefly relates your study to previously published work
 - Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
 - Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
 - Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript (view a [complete listing of our academic editors](#))
 - Lists any recommended or opposed reviewers
- Your cover letter should **not** include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See [PLOS ONE Editorial Policy](#) for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will **not** consider monographs.

All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Supporting Information Captions
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found [below](#).

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

PLOS articles do not support text footnotes. If your accepted submission contains footnotes, you will be asked to move that material into either the main text or the reference list, depending on the content.

Manuscript File Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Word files must not be protected.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the [PLOS ONE LaTeX template](#) and [BibTeX style sheet](#). Articles

prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files will be required. Please consult our [LaTeX guidelines](#) for a list of what will be required.

Microsoft Word Submissions with Equations. If your manuscript is or will be in Microsoft Word and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

1. Format display equations only in MathType (<http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>).
2. Do not use Equations tools or Symbol font for any equation formatting. If your inline equations require special formatting, use MathType.
3. Do not use Graphic Objects.
If you have already composed your article in Microsoft Word and used its built-in equation editing tool, your equations will become unusable during the typesetting process. To resolve this problem, re-key your equations using MathType.

If you do not follow these instructions, PLOS will not be able to accept your file.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
 - Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial
- The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
 - Middle names (or initials, if used), and
 - Last names (surname, family name)
- Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been

submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, one should contribute to **all** of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
 2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
 3. Final approval of the version to be published
 4. Agreement to be accountable for all aspects of the work
- All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

All authors must approve the final manuscript before submission. PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission of the manuscript.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the [PLOS Editorial and Publishing Policies](#) for more information.

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should **not** include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using **human or animal subjects and/or tissue or field sampling** must include required ethics statements. See the [Reporting Guidelines for human research](#), [clinical trials](#), [animal research](#), and [observational and field studies](#) for more information.

Methods sections of papers with **data that should be deposited in a publicly available database** should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. A list of recommended repositories for different types of data can be found [here](#).

Methods sections of papers using **cell lines** must state the origin of the cell lines used. See the [Reporting Guidelines for cell line research](#) for more information.

Methods sections of papers adding **new taxon names** to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new [zoological taxon](#), [botanical taxon](#), or [fungal taxon](#).

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results

relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* [Publication Criteria](#) for more information.

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the *PLOS ONE* [authorship criteria](#) should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should **not** be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

General guidelines

- Authors may cite any and all available works in the reference list.
- Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”).
- If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.
- If [related work](#) has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Reference formatting

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the [NCBI databases](#). A number of reference software companies supply *PLOS* style files (e.g., [Reference Manager](#), [EndNote](#)).

References should be formatted as follows:

- **Published papers.** Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588. Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

- **Accepted, unpublished papers.** Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.
- **Electronic journal articles.** Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.
- **Books.** Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.
- **Book chapters** Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.
- **Published media, not peer-reviewed. Examples: print or online newspapers and magazine articles.** Fountain H (29 Jan 2014). For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. *The New York Times*. Available: <http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.
- **New media, unregulated. Examples: blogs, websites, and other written works.** Allen L (01 Sept 2010) Announcing PLOS Blogs. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>. Accessed 17 March 2014.
- **Master of Science and Doctor of Philosophy theses.** Wells A (1999) Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. Available: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>. Accessed 17 March 2014.
- **Databases and repositories. Examples: figshare, archive.com.** Roberts SB (2013) QPX Genome Browser Feature Tracks. Database: figshare. http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214. Accessed 17 March 2014.
- **Multimedia. Examples: videos, movies, and TV shows.** Hitchcock A, producer and director (1954) *Rear Window* [Film]. Los Angeles: MGM.

Figure Legends

Figures should **not** be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found [here](#).

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Further information about figure legends can be found in the [Figure Guidelines](#).

Supporting Information Captions

Because Supporting Information is accessed via a hyperlink attached to its captions, captions must be listed in the article file. Do not submit a separate caption file. It is acceptable to have them in the file itself in addition, but they must be in the article file for access to be possible in the published version.

The file category name and number is required, and a one-line title is highly recommended. A legend can also be included but is not required. Supporting Information captions should be formatted as follows.

Text S1. Title is strongly recommended. Legend is optional.

Please see our [Supporting Information guidelines](#) for more details.

Data Reporting Guidelines

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article. Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (eg, GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CCBY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include: Dryad and figshare. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

Deposit data in the integrated repository of choice. Once deposition is final and complete, the repository will provide the author with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data. Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS Submission

form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section. If you have any questions, please contact us at plosone@plos.org

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- [ArrayExpress](#)
- [BioModels Database](#)
- [Database of Interacting Proteins](#)
- [DNA Data Bank of Japan \[DDBJ\]](#)
- [DRYAD](#)
- [EMBL Nucleotide Sequence Database](#)
- [GenBank](#)
- [Gene Expression Omnibus \[GEO\]](#)
- [Protein Data Bank](#)
- [UniProtKB/Swiss-Prot](#)
- [ClinicalTrials.gov](#)

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Striking Images

Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.

Please keep in mind that PLOS's [Creative Commons Attribution License](#) applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in PLOS ONE are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.

Care should be taken with the following image types in particular:

1. PLOS ONE is unable to publish any images generated by Google software (Google Maps, Street View, and Earth)
2. Maps in general are usually copyrighted, especially satellite maps
3. Photographs
4. Commercial or government images, slogans, or logos
5. Images from Facebook or Twitter

Authors must also take special care when submitting manuscripts that contain potentially identifying images of people. Identifying information should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal](#) (PDF).

For license inquiries, e-mail [license \[at\] plos.org](mailto:license@plos.org).

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined [above](#). Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as [Supporting Information](#). Please ensure that table formatting conforms to our [Guidelines for table preparation](#).

3. Specific Reporting Guidelines

Human Subject Research

Methods sections of papers on research using human subject or samples must include ethics statements that specify:

- The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s). If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed
- Whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:
 - Why written consent could not be obtained
 - That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent
 - How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

- Explicitly describe their methods of categorizing human populations
 - Define categories in as much detail as the study protocol allows
 - Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency
 - Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis
- In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: "Caucasian" should be changed to "white" or "of [Western] European descent" (as appropriate); "cancer victims" should be changed to "patients with cancer."

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal \(PDF\)](#), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding human subject research, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

Clinical Trials

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the [CONSORT](#) reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the [CONSORT Statement website](#). Before the paper can enter peer review, authors must:

1. Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript
2. Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed [CONSORT checklist](#) as Supporting Information (which will be published alongside the paper, if accepted)
3. Include the [CONSORT flow diagram](#) as the manuscript's "Figure 1"
Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding clinical trials, see the [Editorial Policies](#).

Animal Research

Methods sections of manuscripts reporting results of animal research must include required ethics statements that specify:

- The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s) (where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why)
- Relevant details for efforts taken to ameliorate animal suffering
For example:

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Permit Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The organism(s) studied should always be stated in the abstract. Where research may be confused as pertaining to clinical research, the animal model should also be stated in the title.

We ask authors to follow the [ARRIVE \(Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments\) guidelines](#) for all submissions describing laboratory-based animal research and to upload a completed [ARRIVE Guidelines Checklist](#) to be published as supporting information. Please note that inclusion of a completed ARRIVE Checklist will be a formal requirement for publication at a later date.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding animal research, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

Observational and Field Studies

Methods sections for submissions reporting on any type of field study must include ethics statements that specify:

- Permits and approvals obtained for the work, including the full name of the authority that approved the study; if none were required, authors should explain why
 - Whether the land accessed is privately owned or protected
 - Whether any protected species were sampled
 - Full details of animal husbandry, experimentation, and care/welfare, where relevant
- For more information about *PLOS ONE* policies regarding observational and field studies, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

Cell Line Research

Authors reporting research using cell lines should state when and where they obtained the cells, giving the date and the name of the researcher, cell line repository, or commercial source (company) who provided the cells, as appropriate. Authors must also include the following information for each cell line:

For *de novo* (new) cell lines, including those given to the researchers as a gift, authors must follow our policies for human subject research or animal research, as appropriate. The ethics statement must include:

- Details of institutional review board or ethics committee approval; AND
- For human cells, confirmation of written informed consent from the donor, guardian, or next of kin

For established cell lines, the Methods section should include:

- A reference to the published article that first described the cell line; AND/OR
- The cell line repository or company the cell line was obtained from, the catalogue number, and whether the cell line was obtained directly from the repository/company or from another laboratory

Authors should check established cell lines using the ICLAC Database of Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines to confirm they are not misidentified or contaminated. Cell line authentication is recommended - e.g. by karyotyping, isozyme analysis, or short tandem repeats (STR) analysis - and may be required during peer review or after publication.

Blots and Gels

Authors of manuscripts reporting results from blots (including Western blots) and electrophoretic gels should follow these guidelines:

- In accordance with *PLOS ONE's* policy on image manipulation, the image should not be adjusted in any way that could affect the scientific information displayed, e.g. by modifying the background or contrast
- All blots and gels that support results reported in the manuscript should be provided
- Original uncropped and unadjusted blots and gels, including molecular size markers, should be provided in either the figures or the supplementary files
- Lanes should not be overcropped around the bands; the image should show most or all of the blot or gel. Any non-specific bands should be shown and an explanation of their nature should be given
- The image should include all relevant controls, and controls should be run on the same blot or gel as the samples
- A figure panel should not include composite images of bands originating from different blots or gels. If the figure shows non-adjacent bands from the same blot or gel, this should be clearly denoted by vertical black lines and the figure legend should provide details of how the figure was made

Antibodies

Manuscripts reporting experiments using antibodies should include the following information:

- The name of each antibody, a description of whether it is monoclonal or polyclonal, and the host species
- The commercial supplier or source laboratory
- The catalogue or clone number and, if known, the batch number
- The antigen(s) used to raise the antibody
- For established antibodies, authors are encouraged to supply a stable public identifier from the Antibody Registry (www.antibodyregistry.org).
Authors should also report the following experimental details:

- The final antibody concentration or dilution
- A reference to the validation study if the antibody was previously validated, and if not, details of how the authors validated the antibody for the applications and species used. Authors should consider adding information on new validations to a publicly available database such as [Antibodypedia](#) or [CiteAb](#).

Systematic Review/Meta-Analysis

A systematic review paper, as defined by [The Cochrane Collaboration](#), is a review of a clearly formulated question that uses explicit, systematic methods to identify, select, and critically appraise relevant research, and to collect and analyze data from the studies that are included in the review. These reviews differ substantially from narrative-based reviews or synthesis articles. Statistical methods (meta-analysis) may or may not be used to analyze and summarize the results of the included studies.

Reports of systematic reviews and meta-analyses must include a completed [PRISMA \(Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses\) checklist and flow diagram](#) to accompany the main text. Blank templates are available here:

- Checklist: [PDF](#) or [Word document](#)
- Flow diagram: [PDF](#) or [Word document](#)
Authors must also state in their "Methods" section whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as Supporting Information and provide the registry number in the abstract.

If your article is a Systematic Review or a Meta-Analysis you should:

- State this in your cover letter
- Select "Research Article" as your article type when submitting
- Include the PRISMA flowchart as Figure 1 (required where applicable)
- Include the PRISMA checklist as Supporting Information

Meta-Analysis of Genetic Association Studies

Manuscripts reporting a meta-analysis of genetic association studies must report results of value to the field and should be reported according to the guidelines presented in “[Systematic Reviews of Genetic Association Studies](#)” by Sagoo *et al.*

On submission, authors will be asked to justify the rationale for the meta-analysis and how it contributes to the base of scientific knowledge in the light of previously published results. Authors will also be asked to complete a [checklist](#) outlining information about the justification for the study and the methodology employed. Meta-analyses that replicate published studies will be rejected if the authors do not provide adequate justification.

Paleontology and Archaeology Research

Manuscripts reporting paleontology and archaeology research must include descriptions of methods and specimens in sufficient detail to allow the work to be reproduced. Data sets supporting statistical and phylogenetic analyses should be provided, preferably in a format that allows easy re-use.

Specimen numbers and complete repository information, including museum name and geographic location, are required for publication. Locality information should be provided in the manuscript as legally allowable, or a statement should be included giving details of the availability of such information to qualified researchers.

If permits were required for any aspect of the work, details should be given of all permits that were obtained, including the full name of the issuing authority. This should be accompanied by the following statement:

All necessary permits were obtained for the described study, which complied with all relevant regulations.

If no permits were required, please include the following statement:

No permits were required for the described study, which complied with all relevant regulations.

See the [PLOS ONE Editorial Policies](#) for more information regarding manuscripts describing paleontology and archaeology research.

Software Papers

Manuscripts describing software should provide full details of the algorithms designed. Describe any dependencies on commercial products or operating system. Include details of the supplied test data and explain how to install and run the software. A brief description of enhancements made in the major releases of the software may also be given. Authors should provide a direct link to the deposited software from within the paper.

See the [PLOS ONE Editorial Policies](#) for more information about submitting manuscripts.

Database Papers

For descriptions of databases, provide details about how the data were curated, as well as plans for long-term database maintenance, growth, and stability. Authors should provide a direct link to the database hosting site from within the paper.

See the [PLOS ONE Editorial Policies](#) for more information about submitting manuscripts describing databases.

New Zoological Taxon

For proper registration of a new zoological taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Anochetus boltoni Fisher sp. nov. urn:lsid:zoobank.org:act:B6C072CF-1CA6-40C7-8396-534E91EF7FBB

You will need to contact [Zoobank](#) to obtain a GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper.

Please also insert the following text into the **Methods** section, in a sub-section to be called "Nomenclatural Acts":

The electronic edition of this article conforms to the requirements of the amended International Code of Zoological Nomenclature, and hence the new names contained herein are available under that Code from the electronic edition of this article. This published work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank, the online registration system for the ICZN. The ZooBank LSIDs (Life Science Identifiers) can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID to the prefix "http://zoobank.org/". The LSID for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The electronic edition of this work was published in a journal with an ISSN, and has been archived and is available from the following digital repositories: PubMed Central, LOCKSS [author to insert any additional repositories].

All *PLOS ONE* articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

New Botanical Taxon

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). In association with the [International Plant Names Index](#) (IPNI), the following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature, and apply only to seed plants, ferns, and lycophytes.

Effective January 2012, "the description or diagnosis required for valid publication of the name of a new taxon" can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of a *PLOS ONE* article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Solanum aspersum S.Knapp, sp. nov. [urn:lsid:ipni.org:names:77103633-1] Type: Colombia. Putumayo: vertiente oriental de la Cordillera, entre Sachamates y San Francisco de Sibundoy, 1600-1750 m, 30 Dec 1940, J. Cuatrecasas 11471 (holotype, COL; isotypes, F [F-1335119], US [US-1799731]).

PLOS ONE staff will contact IPNI to obtain the GUID (LSID) after your manuscript is accepted for publication, and this information will then be added to the manuscript during the production phase

In the **Methods** section, include a sub-section called "Nomenclature" using the following wording:

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies. In addition, new names contained in this work have been submitted to IPNI, from where they will be made available to the Global Names Index. The IPNI LSIDs can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID contained in this publication to the prefix <http://ipni.org/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All *PLOS ONE* articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

New Fungal Taxon

When publishing papers that describe a new fungal taxon name, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific fungal name published by us is considered effectively published under

the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature.

Effective January 2012, "the description or diagnosis required for valid publication of the name of a new taxon" can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of a *PLOS ONE* article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Hymenogaster huthii. Stielow et al. 2010, sp. nov.
[urn:lsid:indexfungorum.org:names:518624]

You will need to contact either [Mycobank](#) or [Index Fungorum](#) to obtain the GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper. Effective January 2013, all papers describing new fungal species must reference the identifier issued by a recognized repository in the protologue in order to be considered effectively published.

In the **Methods** section, include a sub-section called "Nomenclature" using the following wording (this example is for taxon names submitted to MycoBank; please substitute appropriately if you have submitted to Index Fungorum):

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS ONE article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies. In addition, new names contained in this work have been submitted to MycoBank from where they will be made available to the Global Names Index. The unique MycoBank number can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the MycoBank number contained in this publication to the prefix <http://www.mycobank.org/MB/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All *PLOS ONE* articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Qualitative Research

Qualitative research studies use non-quantitative methods to address a defined research question that may not be accessible by quantitative methods, such as people's interpretations, experiences, and perspectives. The analysis methods are explicit, systematic, and reproducible, but the results do not involve numerical values or use statistics. Examples of qualitative data sources include, but are not limited to, interviews, text documents, audio/video recordings, and free-form answers to questionnaires and surveys.

Qualitative research studies should be reported in accordance to the Consolidated criteria for reporting qualitative research (COREQ) checklist. Further reporting guidelines can be found in the Equator Network's Guidelines for reporting qualitative research.