

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ATIVIDADE MOLUSCICIDA E CERCARICIDA DO ÁCIDO DIVARICÁTICO
EXTRAÍDO DE *Ramalina aspera*

HIANNA ARELY MILCA FAGUNDES SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

RECIFE

2016

HIANNA ARELY MILCA FAGUNDES SILVA

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA E CERCARICIDA DO ÁCIDO DIVARICÁTICO
EXTRAÍDO DE *Ramalina aspera***

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

RECIFE

2016

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

Silva, Hianna Arely Milca Fagundes

Atividade moluscicida e cercaricida do ácido divaricático extraído de *Ramalina aspera* / Hianna Arely Milca Fagundes Silva. – Recife: O Autor, 2016.
109 f.: il.

Orientadores: Nicácio Henrique da Silva, Ana Maria Mendonça de Albuquerque

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Esquistossomose 2. *Biomphalaria glabrata* 3. *Schistosoma mansoni*
I. Silva, Nicácio Henrique da (orient.) II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (coorient.) IV. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-225

HIANNA ARELY MILCA FAGUNDES SILVA

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA E CERCARICIDA DO ÁCIDO DIVARICÁTICO
EXTRAÍDO DE *Ramalina aspera***

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

Aprovado por:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva - Presidente

Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Prof^a. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins

Prof. Dr. André de Lima Aires

Data: 25/02/2016

A minha amada família, em especial meus pais, e aos queridos amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por todas as vitórias e bênçãos concedidas a mim e a minha família, presenteando-me com paciência, força e alegria para trilhar esse caminho ao qual eu me propus.

Agradeço aos meus pais, Rute (*in memoriam*) e Eliezer, pelo zelo, carinho e amor com os quais fui criada, sendo eles meus exemplos de coragem, força e determinação. A eles, todo o meu amor.

Agradeço aos meus familiares: às minhas amadas tias Ana Isabel, Sara e Miriam, às minhas avós, Maria José e Maria da Conceição, aos meus avôs, Eduardo e Antônio (*in memoriam*) e ao meu amado irmão Fillipe por todas as alegrias e por suas presenças em minha vida.

Agradeço a Rafael, namorado e amigo, que em todas as minhas escolhas me incentiva e apoia. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, pela confiança depositada no meu trabalho e por me receber de braços abertos em seu grupo de pesquisa. Seus ensinamentos foram preciosos para minha formação durante o mestrado e os levarei para a vida. Obrigada, professor!

A minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, por ter plantado em mim, desde o início da graduação, o amor pela pesquisa. Sua orientação por todo o meu caminho na UFPE foi essencial para que aqui eu chegasse. Obrigada pela paciência, confiança e dedicação!

Agradeço aos colaboradores deste trabalho Prof. Dr. Francisco F. Amâncio, Profa. Dra. Mônica Albuquerque, Prof. Dr. André Aires e a Dra. Mônica Martins pela pelos ricos ensinamentos que recebi durante minha graduação e mestrado.

Agradeço aos amigos de laboratório Luís, Luanna, Douglas, Will, Alexsandra, Maíra, Katarine, Luiza, Hassan, Ricardo, Vinícius e João pelos maravilhosos momentos de aprendizado e descontração que temos diariamente.

Agradeço aos grandes mestres que tive, me fazendo descobrir o amor pela minha profissão.

Ao Técnico de Laboratório Sr. João Virgínio pelo imenso suporte e ensinamentos nas práticas laboratoriais no Depto. de Bioquímica e a Sr. Fredson pela colaboração e dedicação conosco do Depto. de Biofísica e Radiobiologia.

A Secretaria e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia por todo o suporte nesses 2 anos de curso.

A vocês, o meu muitíssimo obrigada!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Distribuição mundial da esquistossomose.....	17
Figura 2	Distribuição da esquistossomose no Brasil.....	19
Figura 3	Ciclo biológico de <i>Schistosoma sp.</i>	21
Figura 4	Classificação taxonômica dos moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	24
Figura 5	Molusco do gênero <i>Biomphalaria</i>	25
Figura 6	Imagem de um animal do gênero <i>Biomphalaria</i> retirado da concha para visualização dos órgãos internos.....	27
Figura 7	Distribuição espacial dos hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil.....	30
Figura 8	Estrutura química da niclosamida.....	33
Figura 9	Representação do talo liquênico.....	38
Figura 10	Tipos de talos liquênicos.....	38
Figura 11	Diferenças morfológicas das espécies de <i>Ramalina sp.</i>	40
Figura 12	Estrutura do orcinol e β -orcinol.....	43

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1	Spectrum of HPLC of divaricatic acid obtained from <i>Ramalina aspera</i>	79
Figure 2	Chemical structure of divaricatic acid.....	79
Figure 3	Abnormalities resulting from exposure of <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos to divaricatic acid.....	79
Figure 4	Mortality of <i>Biomphalaria glabrata</i> adult snails exposed to divaricatic acid.....	80
Figure 5	<i>Schistosoma mansoni</i> cercariae exposed to divaricatic acid.....	80
Figure 6	Mortality of <i>Schistosoma mansoni</i> cercariae exposed to divaricatic acid for 120 minutes	81

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1	Unviability of <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos subjected to divaricatic acid at different exposure times (6, 12, 18 and 24 hours)...	82
Table 2	Lethal concentration (LC) for adult snails and <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos exposed to divaricatic acid.....	82
Table 3	Cercariae mortality after exposure to divaricatic acid in relation to exposure time.....	83
Table 4	Lethality of divaricatic acid on <i>Artemia salina</i>	83

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1	A esquistossomose, uma doença tropical negligenciada.....	16
1.2	Epidemiologia da esquistossomose.....	17
1.3	Biologia e ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	20
1.4	Hospedeiros intermediários do gênero <i>Schistosoma</i>.....	23
1.5	O gênero <i>Biomphalaria</i>.....	24
1.5.1	Características biológicas.....	24
1.5.2	Distribuição geográfica.....	30
1.6	Estratégias de controle da esquistossomose.....	31
1.7	Moluscidas no controle de <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	32
1.8	A niclosamida.....	33
1.9	Moluscidas de origem natural.....	34
1.10	Líquens.....	36
1.11	O gênero <i>Ramalina</i>.....	39
1.12	Metabólitos liquênicos.....	41
1.13	Depsídeos e o ácido divaricático.....	43
2	REFERÊNCIAS.....	45
3	OBJETIVOS.....	60
3.1	Geral.....	60
3.2	Específicos.....	60

4	ARTIGO.....	61
5	CONCLUSÕES.....	84
6	ANEXOS.....	85

RESUMO

A esquistossomose, doença infecciosa parasitária, é causada por vermes do gênero *Schistosoma*, sendo o *S. mansoni* a espécie comumente encontrada na África, Caribe e América do Sul. Possuem como hospedeiros intermediários planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, que liberam cercárias que podem infectar os mamíferos, causando a esquistossomose. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 261 milhões de pessoas estejam infectadas. Um dos métodos para o combate desta patologia é o controle populacional de caramujos utilizando moluscidas. A niclosamida, moluscida sintético, é recomendada pela OMS, porém sua utilização tem originado problemas devido à baixa seletividade, elevada toxicidade, alto custo e resistência dos caramujos. Por esta razão, estudos que visam o estabelecimento de moluscidas de origem natural tem sido incentivada. Líquens, organismos simbióticos, produzem diversos metabólitos secundários fenólicos, dentre estes está o ácido divaricático (DIV), para-depsídeo com potencial biológico ainda pouco estudado. No presente estudo, o DIV, isolado de *Ramalina aspera*, foi testado sobre *Biomphalaria glabrata*, vetor da esquistossomose, em sua fase embrionária e adulta, assim como sobre cercárias de *S. mansoni*. Concomitantemente, foi avaliada sua toxicidade ambiental, utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Para a obtenção do DIV, foi realizada a extração etérea de líquens da espécie *R. aspera*. Do extrato etéreo obtido, foi feita a purificação do DIV, sendo a pureza deste confirmada através de cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, infravermelho e ressonância magnética nuclear de prótons. Para a verificação da atividade moluscida do DIV foram utilizados caramujos adultos pigmentados da espécie *B. glabrata* e embriões em fase de blástula. Os animais adultos foram expostos às concentrações de 2,5, 3,5, 4,5 e 5,5 µg/mL por 24 horas e os embriões às concentrações de 7,5; 8; 8,5; 9,5; 10; 10,5; 11; 11,5; 12; 15 e 20 µg/mL nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas. A análise da atividade cercaricida foi realizada por meio da exposição de cercárias (cepa Belo Horizonte) ao DIV nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 100 µg/mL, sendo estas avaliadas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. A toxicidade ambiental sobre *A. salina* foi verificada por exposição dos náuplios às concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL por 24 horas. Ao final das análises, pôde-se observar que o DIV purificado mostrou-se eficiente na eliminação dos caramujos adultos e embriões de *B. glabrata*, apresentando 100% de letalidade em 5,5 µg/mL e 15 µg/mL em 24 horas, respectivamente. Já para a atividade cercaricida, a concentração necessária para 100% de eficácia foi 10 µg/mL. De acordo com os resultados de toxicidade ambiental, a utilização do DIV é segura até a concentração de 200 µg/mL, não mostrando valores de mortalidade significativos estatisticamente. Os resultados deste estudo se mostraram eficientes para o controle da esquistossomose, já que o DIV apresentou-se como uma ferramenta de elevado potencial biológico no combate ao vetor da parasitose, dentro das faixas preconizadas pela OMS, tanto em sua fase embrionária quanto em fase adulta. Também mostrando eficácia sobre a forma cercariana do parasito, sendo atóxica ambientalmente.

Palavras-chave: *Biomphalaria*, *Schistosoma mansoni*, líquens.

ABSTRACT

Schistosomiasis, parasitic infectious disease, is caused by worms of the genus *Schistosoma*, and the *S. mansoni* species is commonly found in Africa, Caribbean and South America. They have as intermediate host snails of the genus *Biomphalaria*, which release cercariae that can infect mammals causing schistosomiasis. The World Health Organization (WHO) estimates that 261 million people are infected. One method for combating this disease is the control of snails population using molluscicides. Niclosamide, synthetic molluscicide, is recommended by the WHO, but its use has caused problems because of the low selectivity, high toxicity, high cost and resistance of snails. For this reason, studies regarding the establishment of natural molluscicides has been encouraged. Lichens, symbiotic organisms produce various phenolic secondary metabolites, among them is the divaricatic acid (DIV), para-depside with biological potential yet little studied. In this study, the DIV, isolated from *Ramalina aspera*, has been tested on *Biomphalaria glabrata*, schistosomiasis vector in its embryonic and adult stage and on cercariae of *S. mansoni*. Concomitantly, its environmental toxicity was evaluated using the microcrustacean *Artemia salina*. From the ether extract of *R. aspera* performed, the DIV purification was done, and its purity confirmed by thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography, infrared and nuclear magnetic resonance of protons. The molluscicidal activity of DIV was verified through of pigmented adult snails of the species *B. glabrata* and embryos in the blastula stage. Adult snails were exposed to concentrations of 2.5, 3.5, 4.5 and 5.5 µg/mL for 24 hours and the embryos at concentrations of 7.5, 8, 8.5, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 15 and 20 µg/mL at times of 6, 12, 18 and 24 hours. The analysis of cercaricide activity was performed by exposing the cercariae (Belo Horizonte strain) to the DIV at concentrations of 0.5, 1, 5, 10 and 100 µg/mL, which are evaluated at times of 15, 30, 60 and 120 minutes. The environmental toxicity in *A. salina* was verified by exposing the nauplii at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL for 24 hours. At the end of the analyzes, it was observed that the DIV purified was efficient in the elimination of adult snails and embryos of *B. glabrata*, with 100% mortality at 5.5 µg/mL and 15 µg/mL in 24 hours, respectively. As for the cercaricide activity, the concentration required for 100% efficacy was 10 µg/mL. According to the results of environmental toxicity, the use of the DIV is safe even the concentration of 200 µg/mL, showing no statistically significant mortality values. The results of this study proved effective in the control of schistosomiasis as the DIV proved to be a high potential biological tool in combating vector parasitosis, within the ranges recommended by the WHO, both in its embryonic stage and in adulthood. Also showing effectiveness on cercariae form of the parasite, non-toxic environmentally.

Keywords: *Biomphalaria*, *Schistosoma mansoni*, lichens.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A Esquistossomose, uma doença tropical negligenciada.

A esquistossomose, também popularmente conhecida como bilharzíase, é uma doença parasitária causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* (COLLEY et al., 2014; NEVES, 2005). Três espécies de *Schistosoma* são majoritariamente responsáveis pelas infecções, estando distribuídas globalmente da seguinte forma: *S. haematobium* (África Subsaariana), *S. japonicum* (República da China, Indonésia e Filipinas) e *S. mansoni* (principalmente na África Subsaariana, Brasil e Ilhas do Caribe) (GRIMES et al., 2015).

A esquistossomose se enquadra na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD – Neglected Tropical Disease) estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo estas um grupo diversificado de doenças que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetando mais de 1 bilhão de pessoas (WHO, 2009). Várias das principais NTDs do mundo ocorrem no Brasil. O número de pessoas afetadas por estas enfermidades são mais elevadas em regiões de maior pobreza, existindo uma relação direta entre a prevalência destas doenças e o índice de desenvolvimento humano (IDH) (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Pesquisas voltadas para o estudo e controle das Doenças Negligenciadas são incentivadas por centros de estudos públicos e privados, porém a produção científica dificilmente é revertida em avanços terapêuticos como novos fármacos, métodos de diagnóstico e vacinas. A principal razão apontada para o déficit terapêutico neste campo é o baixo interesse da indústria farmacêutica, já que sendo doenças endêmicas em populações de baixa renda, em sua maioria, em países em desenvolvimento, o potencial de retorno lucrativo para essas indústrias seria mínimo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; VIRMOND, 2010).

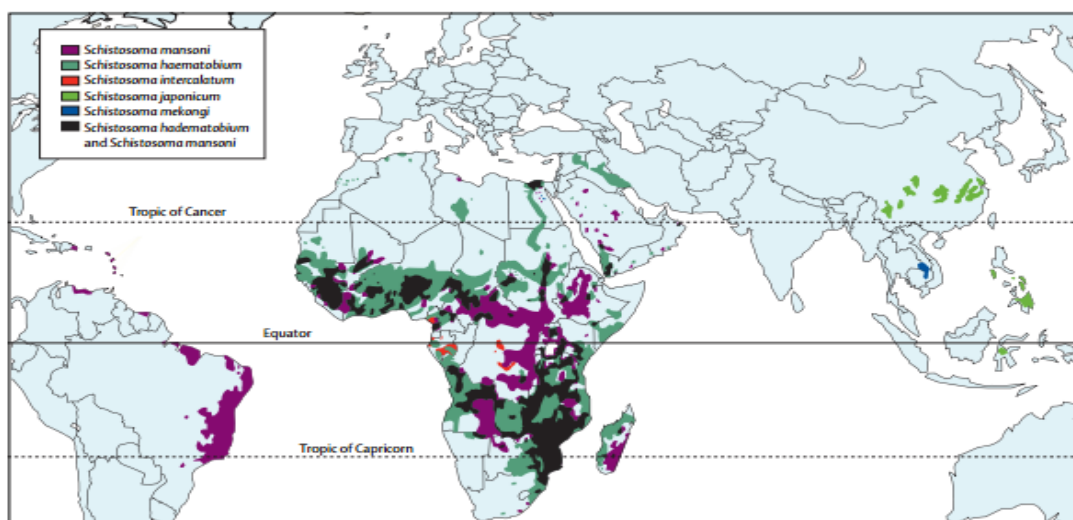
As doenças tropicais negligenciadas, em destaque a esquistossomose, incapacitam e desfiguram os indivíduos acometidos. Registradas há anos, carregam um estigma social significativo, resultando muitas vezes em isolamento, levando-os a evitar a busca por tratamento médico. Possuem relevante impacto social, já que afetam indivíduos em faixa etária produtiva e prejudicam o crescimento infantil, interferindo na construção cognitiva e,

consequentemente, a capacidade de crescimento e desenvolvimento social das futuras gerações (KEALEY, 2010).

1.2 Epidemiologia da Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença presente em populações humanas há milhares de anos. Em análises de múmias egípcias, foram encontradas lesões típicas e antígenos do parasito. Sendo o homem o principal hospedeiro do trematódeo *S. mansoni*, supõe-se que esta relação parasito/hospedeiro date de tempos ainda remotos (NEVES, 2005). Mundialmente, cerca de 261 milhões de indivíduos encontram-se infectados com trematódeos do gênero *Schistosoma*, estando, aproximadamente, 120 milhões apresentando os sintomas da doença e 20 milhões em situação grave (WHO, 2015; LEONARDO et al., 2012; TLAMÇANI; ER-RAMI, 2014).

Figura 1 – Distribuição mundial da esquistossomose.



Fonte: FERRARI; MOREIRA, 2011.

De todos os 76 países em que a esquistossomose é endêmica, 46 estão na África, respondendo por 97% de todas as infecções e por 87% da população sob o risco de contraí-la (STEINMANN et al., 2006; TLAMÇANI; ER-RAMI, 2014). Um estudo epidemiológico

realizado na Etiópia revelou que 73.9% de prevalência da doença no país, com muitos dos casos apresentando hepatomegalia, esplenomegalia e fibrose periportal. Um total de 29 milhões de pessoas estão infectadas na Nigéria, 19 milhões na Tanzânia, 15 milhões na República Democrática do Congo e em Gana, enquanto Moçambique apresenta 13 milhões de indivíduos infectados com o *Schistosoma* (ADENOWO et al., 2015).

A esquistossomose foi erradicada, com sucesso, no Japão e Tunísia. O Marrocos e alguns países caribenhos tem feito progressos significativos no controle da doença, enquanto o Brasil, China e Egito caminham na busca de alternativas para o controle da doença (ADENOWO et al., 2015). Desde 1950, a China desenvolve um eficiente programa de controle da esquistossomose, onde o foco se volta para a eliminação de caramujos infectados. Dos 454 municípios endêmicos, 274 erradicaram completamente a ocorrência de transmissão (XU et al., 2015).

A descoberta da presença de focos de transmissão de esquistossomose na Europa é recente. Um surto de esquistossomose urogenital foi descrito, atingindo a França, Alemanha e Itália, acreditando-se que a infecção tenha se iniciado em Córsega, em um rio ao norte de Porto-Vecchio, um destino turístico popular. Provavelmente, a chegada da esquistossomose nestes países está relacionada com migração de pessoas infectadas de regiões endêmicas da África, para a Europa, já que o parasita, o *S. haematobium*, tem distribuição exclusiva em países da África (BOISSIER et al., 2015).

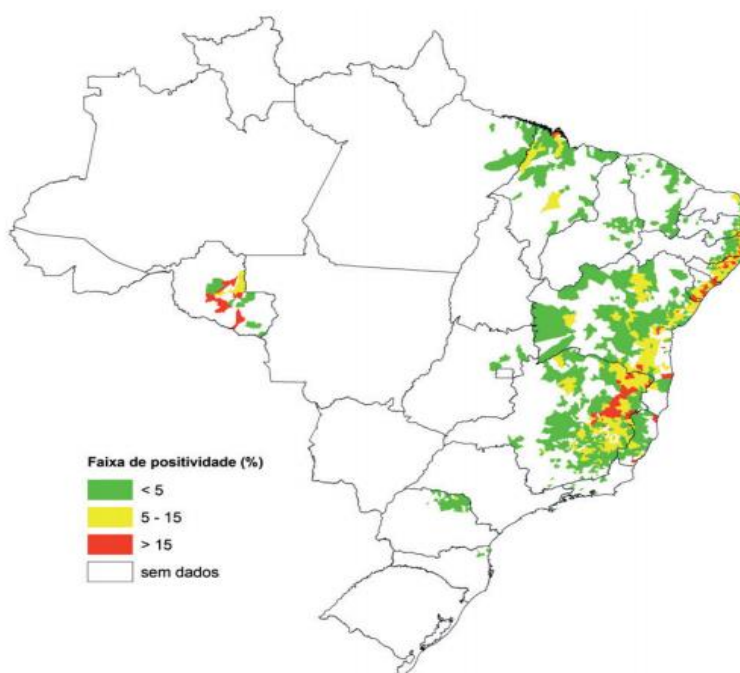
No Brasil, encontram-se 96% dos casos de esquistossomose de toda América Latina e Caribe (MARTINS-MELO et al., 2015). Outros focos de transmissão no continente americano são encontrados na Colômbia, Venezuela, Porto Rico, República Dominicana, Santa Lúcia, Guadalupe, Martinica, St. Kitts, Suriname, Montserrat, Haiti e San Martin (GOVERNO DE SÃO PAULO, 2007; CARDIM, 2010; NOYA et al., 2015).

A chegada da esquistossomose no Brasil se deu pela imigração de escravos africanos infectados, e a presença de hospedeiros intermediários do ciclo do *S. mansoni* permitiram a instalação da doença no país. Os focos primários da doença se deram na região canavieira nordestina. A partir daí, com os movimentos migratórios (ciclo do ouro, ciclo da borracha,

ciclo do café e industrialização), a esquistossomose se expandiu para outras regiões do país (NEVES, 2005). A esquistossomose, há anos atrás, tinha predominância rural, porém movimentos populacionais de zonas endêmicas e a expansão natural dos habitats dos vetores resultou no aparecimento de focos endêmicos em regiões urbanas (BLANTON et al., 2015; BARBOSA et al., 2011).

A esquistossomose tem uma extensa área com focos de transmissão, abrangendo 19 Unidades Federadas brasileiras e se concentrando nas regiões sudeste e nordeste (Figura 2). As áreas de transmissão estão diretamente ligadas à presença de caramujos do gênero *Biomphalaria*, sendo as mais afetadas caracterizadas por condições sanitárias precárias, pobreza e baixa escolaridade da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). The Global Burden of Disease Study 2010 indicou que a esquistossomose é a 100ª causa de mortalidade no Brasil, representando 3,6% das estimativas globais (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2013).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014.

Hoje, no Brasil, a esquistossomose apresenta sua distribuição em terras contínuas e contíguas, em quase toda a costa litorânea desde o Rio Grande do Norte até o Sul do país, se interiorizando alcançando Minas Gerais, no Sudeste, acompanhando várias bacias hidrográficas importantes nessas regiões. Sendo assim, encontram-se focos da doença nos Estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia, Piauí, Maranhão, Pará, Rondônia, Goiás, Distrito Federal, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O Nordeste do país concentra os maiores números em prevalência da doença, observando-se, em vários Estados, um aumento de casos de esquistossomose. O estado de Pernambuco se destaca por possuir uma das mais altas prevalências humanas, ocupando o 3º lugar da Região Nordeste, com concentração na Zona da Mata Sul e Norte, onde a taxa de prevalência supera os 25%. É endêmica em 93 dos 185 municípios pernambucanos e pesquisas recentes apontam para uma expansão da endemia no Estado de Pernambuco (FAVRE et al., 2001; COURA; AMARAL, 2004; SILVA; DOMINGUES, 2011). A expansão da doença para o litoral e para a região metropolitana da capital pernambucana é mantida pelo movimento populacional de trabalhadores rurais infectados para as periferias dos grandes centros urbanos e polos turísticos litorâneos (BARBOSA et al., 2008).

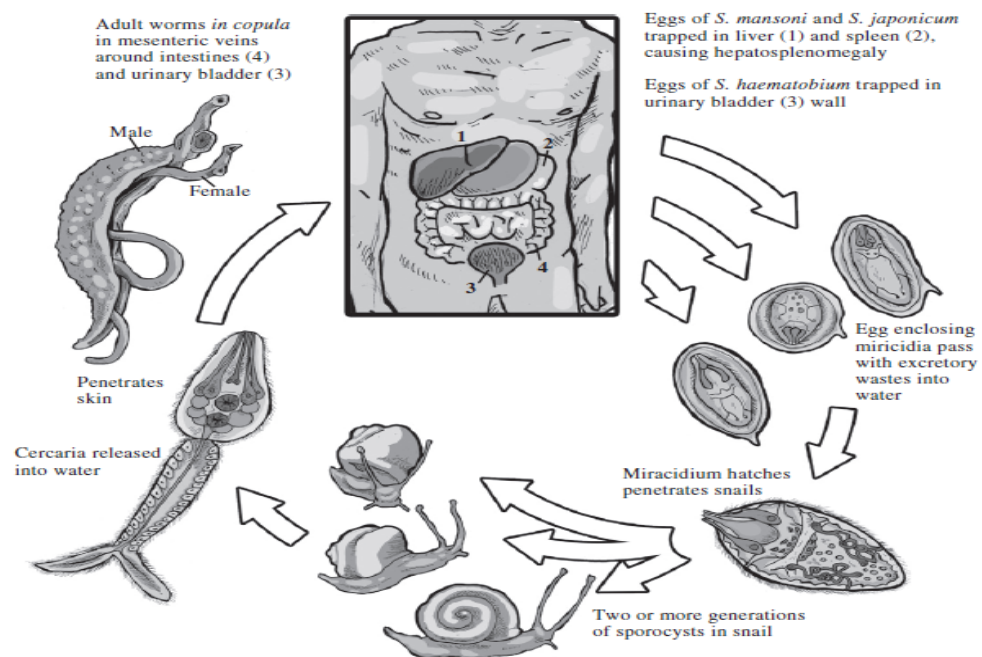
1.3 Biologia e ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.

A descoberta do parasito causador da esquistossomose foi feita pelo cirurgião alemão Theodor Bilhaz, enquanto trabalhava na Escola de Medicina Kasr-El-Aini, no Egito. Décadas depois, Sonsino, também no Egito, elucidou o ciclo de vida do parasito (BARSOU; ESMAT; EL-BAZ, 2013). No ano de 1994, a Organização Mundial de Saúde iniciou o “*Schistosoma* Genome Network”, projeto que levou a descoberta do genoma do parasito. Os primeiros dados foram publicados em 2009, os quais evidenciaram 7 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (ZW fêmea e ZZ macho) (BERRIMAN et al., 2009). Posteriormente, o sequenciamento do DNA mitocondrial fundamentou a classificação das 21 espécies de *Schistosoma* encontradas (YOUNG et al., 2012).

A família Schistosomatidae é representada por vermes trematódeos que parasitam mamíferos, crocodilianos e aves, tendo como habitat o sistema venoso destes animais (MORAND; MULLER-GRAF, 2000). Algumas características tornam o gênero *Schistosoma* diferenciado, quando comparado com os demais trematódeos: as fases larvais deste gênero completam parte de seu desenvolvimento em gastrópodes de água doce, apresentam sexos distintos (dióicos), eliminam ovos não operculados com um espinho lateral, os quais são embrionados e apresentam uma fase de desenvolvimento infectante para o hospedeiro definitivo (cercárias) (SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

O *S. mansoni* apresenta um complexo ciclo biológico (Figura 3), demonstrando uma excelente capacidade adaptativa ao meio ambiente e aos seus hospedeiros intermediários e definitivos (NEVES, 2005). O seu ciclo de vida é composto por duas fases: uma fase sexuada e outra fase assexuada. A fase sexuada se inicia com a penetração de cercárias (segunda fase larval do parasito) através da pele e mucosas do hospedeiro definitivo, o qual entrou em contato com coleções aquáticas contaminadas (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Figura 3 – Ciclo biológico de *Schistosoma* sp.



Fonte: BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013.

O período de maior infectividade das cercárias ocorre nas primeiras oito horas após a sua liberação no meio aquático pelos caramujos, porém podem permanecer ativas, em condições favoráveis, por até 48 horas (NEVES, 2005). Durante o processo de penetração, as cercárias se fixam na pele ou mucosas do hospedeiro com o auxílio de suas duas ventosas (oral e ventral) e da liberação de uma substância mucoprotéica secretada por suas glândulas acetabulares. Ao atingir os capilares subcutâneos, o parasito perde a cauda bífida, se transformando em esquistossômulo, sendo levado pela corrente sanguínea ao lado direito do coração e, conseqüentemente, alcançando os capilares pulmonares (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Após atingir os pulmões, os esquistossômulos migram para o sistema porta, podendo seguir este percurso por duas vias: (1) na via sanguínea, comumente mais aceita e de maior importância, os esquistossômulos saem das arteríolas pulmonares e dos capilares alveolares, ganhando a pequena circulação e chegando ao lado esquerdo do coração. Ganham a grande circulação através do fluxo aórtico e chegam até o sistema porta intra-hepático e ali se fixam. Já pela (2) via transtissular, os esquistossômulos saem dos alvéolos pulmonares através da penetração do parênquima pulmonar, pleura e diafragma, alcançando a cavidade peritoneal e perfurando a cápsula e parênquima hepático, chegando ao sistema porta intra-hepático (NEVES, 2005).

Chegando à maturidade em, aproximadamente, 25-28 dias após a infecção, os esquistossômulos se diferenciam em machos e fêmeas, os quais vivem em cópula quase contínua. As fêmeas realizam a postura dos ovos na veia mesentérica inferior e, aproximadamente, 400 ovos são postos por dia a nível de submucosa, demorando cerca de 8 dias para se tornarem maduros (formação completa do miracídio). Os ovos podem ser observados 42 dias após a infecção, nas fezes do hospedeiro (NEVES, 2005; BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

A fase assexuada do ciclo de biológico de *S. mansoni* se inicia com o contato dos ovos eliminados pelo hospedeiro infectado e a água doce. Havendo a eclosão dos ovos, em condições ambientais favoráveis de temperatura, luminosidade e oxigenação, miracídios serão liberados no meio, infectando os caramujos (hospedeiros intermediários). A capacidade do

miracídio em penetrar o caramujo se limita a, aproximadamente, 8 horas após a sua eclosão. Neste período, a ação em conjunto dos intensos movimentos miracidianos e de enzimas proteolíticas liberadas por sua glândula de penetração, permitem ao miracídio ultrapassar os tecidos do caramujo. Após 48 horas da infecção do hospedeiro intermediário, o parasito sofre diversas mudanças morfológicas, se transformando em esporocisto, os quais darão origem, por um intenso processo de multiplicação, a novas cercárias. Um único miracídio gera em torno de 100 a 300 mil cercárias, que apresentam sexo definido. A emergência das cercárias para o meio aquático é diretamente influenciada por diversos fatores, sendo os principais a luminosidade e temperatura. Ao atingir novamente um hospedeiro definitivo, o ciclo se reinicia (NEVES, 2005; BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Diversas evidências sugerem que os ovos do parasita, e não a presença do próprio verme, que induzem a morbidade causada pela esquistossomose (BURKE et al., 2009). Muitos dos ovos depositados pelo parasita não são eliminados nas fezes, permanecendo por um longo tempo no intestino e fígado (*S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. mekongi*). Ali, os ovos induzem uma resposta imunológica do hospedeiro, resultando na formação de granulomas, caracterizado, em grande parte, por linfócitos, eosinófilos e macrófagos ativados (PEARCE; MACDONALD, 2002; FAIRFAX et al., 2012; COLLEY et al., 2014). A formação dos granulomas progride para a fibrose hepática irreversível e, conseqüentemente, hipertensão portal grave (ELBAZ; ESMAT, 2013; COLLEY et al., 2014). Como sintomatologia inicial, a esquistossomose é caracterizada pelo aparecimento de febres, distúrbios pulmonares e gastrointestinais e na fase crônica, aparecem inflamações hepáticas e esplênicas, com possível distensão abdominal (CANTANHEDE et al., 2010).

1.4 Hospedeiros Intermediários do Gênero *Schistosoma*.

Quatro gêneros de moluscos podem albergar parasitos *Schistosoma* de importância médica e epidemiológica, servindo como hospedeiros intermediários de seu ciclo de vida, são eles: os moluscos do gênero *Biomphalaria* sp. (*S. mansoni*), *Bulinus* sp. (*S. haematobium* e *S.*

intercalatum), *Oncomelania* sp. (*S. japonicum*), e a espécie *Neotricula aperta* (*S. mekongi*) (ROZENDAAL, 1997; ATTWOOD; UPATHAM, 2012).

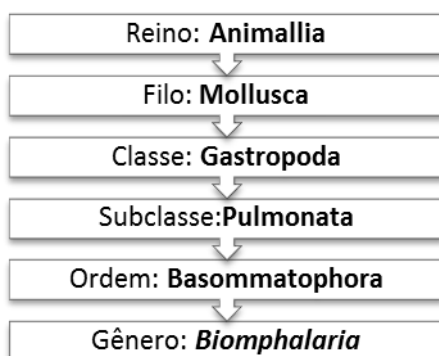
No Brasil, três espécies do gênero *Biomphalaria* sp. são encontradas naturalmente sendo infectadas por *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (D'orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Infecções experimentais foram documentadas nas espécies *Biomphalaria peregrina* (D'orbigny, 1835), *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) e *Biomphalaria cousini* (Paraense, 1966) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.5 O Gênero *Biomphalaria*

1.5.1 Características Biológicas

A classificação taxonômica, segundo REY (2001), dos moluscos do gênero *Biomphalaria* está de acordo com a Figura 4.

Figura 4 – Classificação taxonômica dos moluscos do gênero *Biomphalaria*.



Fonte: REY, 2001.

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* (Figura 5) tem como habitat locais de água doce límpida, com microflora rica e bastante matéria orgânica, boa iluminação, temperatura média de 20°C a 26°C e pH neutro. Sua alimentação tem como base folhas e algas (NEVES, 2005). Geralmente, são encontrados em coleções de água com velocidade inferior a 30 cm/s, podendo, também, serem encontrados em córregos, lagoas, pântanos, remansos de rios,

margens de reservatórios, valas de irrigação e drenagem, pequenos açudes, caixas d'água, etc. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Figura 5 – Molusco do gênero *Biomphalaria*.



Fonte: BRITO, 2011, disponível em <http://www.fiocruz.br> (acesso em novembro de 2015).

A presença de vegetações verticais e/ou flutuantes nos habitats é de grande importância, pois servem como alimento e abrigo para os caramujos, além disso podem exercer a função de suporte para o depósito de desovas. Ao serem expostos às condições ambientais desfavoráveis, os caramujos *Biomphalaria* desenvolveram mecanismos de defesa, como: (1) anidrobiose, em que a dessecação do animal ocorre lenta e progressivamente, geralmente em situações de seca, onde o animal pode sobreviver por mais de 6 meses. (2) Enterramento, onde o caramujo se enterra no solo de ambientes aquáticos. Este comportamento de proteção pode coincidir com a resposta dos animais à aplicação de agentes moluscicidas. (3) A diapausa, em que o animal para bruscamente seu desenvolvimento, sendo este processo controlado por fatores internos, mesmo em condições favoráveis. (4) E a quiescência, a qual é determinada diretamente pelas condições ambientais externas e desfavoráveis, causando a parada do desenvolvimento do animal, induzida pelo aumento (estivação) ou pela redução (hibernação) da temperatura do meio. Mesmo em estado de anidrobiose, enterramento, diapausa ou quiescência, os caramujos podem carregar consigo as formas imaturas do *S. mansoni*, os quais retomam suas atividades quando as condições ambientais voltam à normalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os biótopos em que vivem esses moluscos, em sua maioria, tem pH em torno de 6,0 a 8,0. Em coleções aquáticas com pH inferior, os planorbídeos são incapazes de promover a deposição de cálcio para a formação da concha, o que impede sua colonização nesses habitats. Densidades populacionais elevadas desses animais geralmente são encontradas em águas mais duras, ricas em cálcio (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

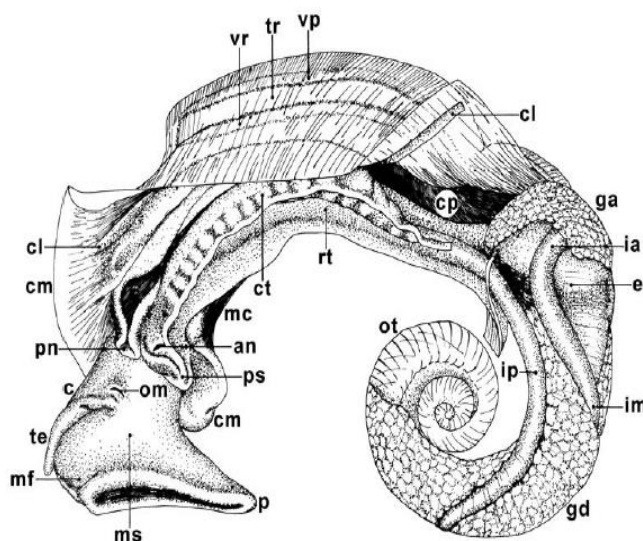
A espécie *Biomphalaria glabrata* é o maior molusco da família Planorbidae, possuindo até 40 mm de diâmetro, 11 mm de largura e concha com seis a sete giros, sinistrógiras, enrolados em espiral plana sem opérculo. Sua periferia é arredondada com tendências para a direita, com o lado direito mais escavado que o esquerdo (REY, 2001; NEVES, 2005). A concha dos gastrópodes consiste em um número variado de camadas orgânicas e calcárias. O perióstraco, camada mais externa da concha, constituída exclusivamente de material orgânico, é composto por um material proteico, associado à quinonas, que confere o tom amarronzado à concha, conhecido como cochiolina. As camadas internas consistem em cristais de carbonato de cálcio, sob a forma de aragonita ou calcita, sob matriz proteica (BARNES; RUPPERT, 1996).

Os sais de cálcio para a síntese das conchas são provenientes dos alimentos, ficando depositados no hepatopâncreas sob a forma de fosfatos. Quando a síntese das conchas é necessária, os depósitos são mobilizados e transportados através da hemolinfa do animal até o manto, sofrendo ação das fosfatases e transformados em carbonatos (REY, 2001).

O trato digestivo desses animais consiste em uma boca, cavidade bucal, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus (Figura 6). A boca, de posição anterior na cabeça, abre-se para dentro da cavidade bucal (BARNES; RUPPERT, 1996). Possuem espessamentos cuticulares denominados mandíbula e rádula, fita alongada e revestida de numerosos denticulos quitinosos em forma de gancho, direcionados para o interior da cavidade bucal (CANTINHA, 2008; REY 2001). Na maioria dos gastrópodes, a rádula é um órgão de alimentação altamente desenvolvido, ralando e cortando os alimentos. A digestão extracelular ocorre no estômago, devido à ação de enzimas provenientes das bolsas esofágicas e do ceco digestivo. O intestino estende-se da extremidade anterior do estômago através da massa visceral, para se abrir via ânus, do lado direito da cavidade do manto. A porção terminal do

sistema digestivo é o reto, que tem por função a formação, compactação e armazenamento das fezes (BARNES; RUPPERT, 1996; MOORE, 2003).

Figura 6 – Imagem de um animal do gênero *Biomphalaria* retirado da concha, para a visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).



Fonte: PARAENSE, 1975

Sua alimentação é quase que exclusivamente vegetal. Em criadouros, podem consumir folhas de alface, agrião, couve e fatias de cenoura. Em habitat natural, sua alimentação se direciona a vegetais em decomposição do fundo e das margens das coleções aquáticas. Já os caramujos recém-eclodidos, se alimentam de algas unicelulares presentes no meio (CANTINHA, 2008; NEVES, 2005; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001).

A respiração é realizada pelo saco pulmonar e pseudobrânquias, pregas tegumentares rica em vasos. O saco pulmonar é o principal órgão respiratório, se abrindo na cavidade paleal, abaixo do manto, através de uma prega denominada pneumóstoma (REY, 2001; CANTINHA, 2008; NEVES, 2005; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001).

O rim é uma estrutura alongada, com inúmeros septos e granulações internas, iniciando-se na cavidade pericárdica até a borda do manto, terminado no ureter, que se abre próximo ao ânus e pneumostômio. O rim é dotado de uma prega mucosa, saliente e pigmentada, denominada de crista renal (BARNES; RUPPERT, 1996; REY, 2001; NEVES, 2005).

O sistema nervoso central dos moluscos é formado por diversos pares de gânglios, estando alguns associados a um anel nervoso esofágico e dois pares de cordões nervosos longitudinais. Os gânglios estão contidos em uma capsula de tecido conjuntivo, estando conectados a receptores sensoriais por neurônios aferentes ou sensoriais, e a músculos e glândulas por neurônios eferentes ou motores. Os órgãos sensoriais dos gastrópodes incluem olhos, receptores de contato (tentáculos), um par de órgãos do equilíbrio e orientação locomotora (otocistos), osfrádios (órgão quimiossensorial) e quimiorreceptores, modificados ou não, denominados de rinóforos (REY, 2001; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; BARNES; RUPPERT, 1996).

Esses moluscos são hermafroditas, possuindo gônada única em forma de cachos, denominada de ovoteste, onde óvulos e espermatozoides são produzidos lado a lado, porém não podendo produzi-los ao mesmo tempo. O ovoteste possui diversos folículos, sendo cada um uma unidade de produção de gametas femininos e masculinos (CANTINHA, 2008). Por viverem em colônias, esses moluscos optam pela fecundação cruzada, o que propicia uma maior variabilidade genética, realizando a autofecundação em circunstâncias críticas (NEVES, 2005; CIMERMAM; CIMERMAM, 2001; CANTINHA, 2008; AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

Em situações de adversidade, poucos indivíduos podem realizar a autofecundação, iniciando uma nova população (PALASIO et al., 2015). Apenas um caramujo pode gerar 10 milhões de descendentes em cerca de 3 meses, repovoando um criadouro quase extinto. O número de embriões em uma desova, bem como o número total de desovas postas pelos animais é variável, dependendo de fatores biológicos e ambientais, os quais influenciam a fecundidade e viabilidade dos ovos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O sistema circulatório desses animais é composto por coração com duas cavidades: aurícula e ventrículo. O sangue ou hemolinfa compõe-se de elementos amebóides (hemócitos), plasma rico em água, cloreto de sódio, bicarbonatos e hemoglobina contendo ferro dissolvido, o que permite a utilização do oxigênio à baixa tensão. Entre as proteínas presentes na hemolinfa de *B. glabrata*, a hemoglobina constitui cerca de 97% das proteínas totais presentes (PESSÔA; MARTINS, 2011; REY, 2001; VERRENGIA GUERRERO et al., 1997). Os hemócitos são as principais células efectoras do sistema de defesa do caramujo, podendo se mover livremente para dentro e fora dos tecidos, já que o seu sistema circulatório é aberto (KNAAP; LOKER, 1990).

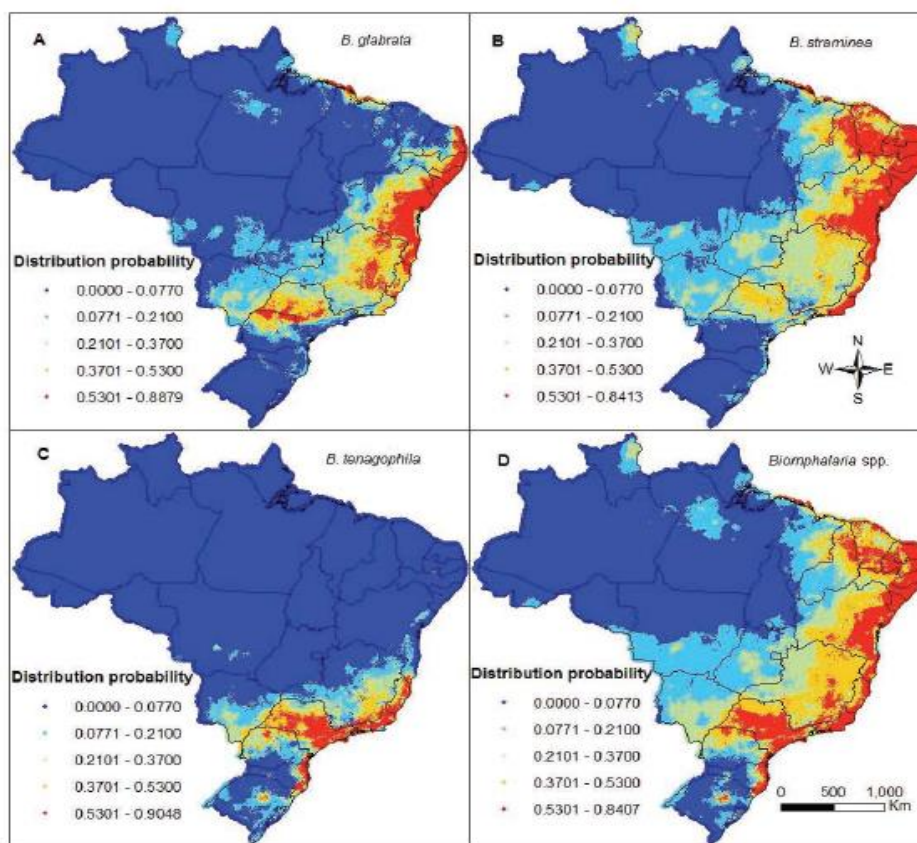
Poucos relatos são encontrados na literatura sobre a presença de um órgão hematopoiético especializado nos moluscos gastrópodes e bivalves, existindo uma indicação de que nestes animais, as células da hemolinfa são formadas por todo o corpo. E presença de amebócitos (hemócitos) está dividida entre a circulação sanguínea e tecido conectivo, o que favorece o grande sucesso adaptativo destas espécies, que ocupam posição de destaque no filo Mollusca (SOUZA, 2006).

A origem e produção dos hemócitos ainda não está definida. Alguns autores admitirem uma origem multicêntrica, a partir de células conjuntivas (SOUZA, 2006). Outros autores propõem que estes sejam produzidos em um órgão especial, localizado na parede sacular renal, a qual forma parte do saco pericárdico e que foi denominado APO (Amebocyte Producing Organ) (SALAMAT; SULLIVAN, 2009). Representam um papel de fundamental importância no sistema de defesa dos moluscos, exercendo atividades de fagocitose, encapsulação, liberação de substâncias citotóxicas, transporte de cálcio no reparo tecidual e na produção de fatores coagulantes. Estas células lembram, em sua forma e função, os macrófagos dos animais vertebrados (ABDUL-SALAM; MICHELSON, 1980; AMEN et al., 1992; BAYNE; BUCKLEY; DEWAN, 1980; CAVALCANTI, 2011).

1.5.2 Distribuição Geográfica

A espécie *Biomphalaria glabrata* (Figura 7-A) é considerada a mais importante quando se trata de epidemiologia, já que é a mais susceptível à infecção por *S. mansoni* (SCHOLTE et al., 2012). Sua presença já foi registrada nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe, além do Distrito federal, abrangendo 801 municípios (CARVALHO et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Figura 7 – Distribuição espacial dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil.



Fonte: SCHOLTE et al., 2012

A espécie *Biomphalaria straminea* é a mais resistente quando se trata de adaptação à fatores ambientais, sendo encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do país. Apesar da menor susceptibilidade à infecção por *S. mansoni*, possui a maior abrangência entre os

estados brasileiros quando comparada às espécies (Figura 7-B). Sua presença já foi registrada nos Estados do Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Roraima, totalizando 24 estados (CARVALHO et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A espécie *Biomphalaria tenagophila* (Figura 7-C) possui importância epidemiológica nas regiões Sul e Sudeste (SCHOLTE et al., 2012), sendo registrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, abrangendo 562 municípios (CARVALHO et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A distribuição geográfica das três espécies do gênero *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil é demonstrada na Figura 7-D.

1.6 Estratégias de Controle da Esquistossomose.

A partir da década de 50, a OMS vem elaborando diversas estratégias de controle para a esquistossomose que variam até os dias atuais, devido à dificuldade do controle da doença (WHO, 1953, 1965, 1973, 1985, 1993, 2002). Na década de 50 se iniciaram os estudos visando à descoberta de novos agentes moluscicidas, bem como de fármacos que eliminassem o agente etiológico da doença. Como nenhum fármaco foi promissor no combate ao *S. mansoni*, a aplicação de moluscicidas era reconhecida como a medida mais efetiva no que diz respeito ao controle da esquistossomose na década de 60. Em meados dos anos 70, com a descoberta da oxamniquina (Pfizer) e do praziquantel (Bayer e Merck), a associação de agente moluscicidas e quimioterápicos foi estimulada, estando comprovada que esta aliança proporcionava resultados mais rápidos sobre a incidência, prevalência e transmissão da doença. A partir dos anos 2000 o controle da esquistossomose passou a ser integrado ao das geo-helminthíases (CARVALHO et al., 2008; RAPADO, 2012; WHO, 2002).

Diversas autoridades no tema concordam que a estratégia mais eficaz para o controle da doença deve se basear na associação de esforços combinando várias abordagens preventivas (OTHMAN; SOLIMAN, 2015) como educação em saúde e higiene, melhorias nas condições sanitárias, disponibilização do acesso à água potável e saneamento básico são medidas necessárias para limitar as chances da infecção por *S. mansoni*. Porém, na maioria dos países onde a doença é endêmica, esses esforços são, em sua maioria, deficientes devido à falta de recursos (GRIMES et al., 2014; GRIMES et al 2015).

A distribuição dos caramujos vetores é um fator de extrema importância na transmissão da esquistossomose, já que são os hospedeiros intermediários do ciclo do parasito. Seu controle se torna prioritário para a diminuição da transmissão da doença devido à interrupção do contato humano com cercárias liberadas pelos caramujos em coleções de água doce (CHITSULO et al., 2000; PARAENSE, 1983; CARVALHO et al., 2008).

Diversas metodologias já foram empregadas no controle dos moluscos, sendo estas: ambientais (canalização, aterros, drenagens e limpezas das margens de coleções de água), biológicas (incorporação de predadores e microrganismos nos habitats dos caramujos) e químicas (uso de substâncias moluscicidas) (TELES; CARVALHO, 2008; MORAES, 2011). Tem-se que levar em conta, porém, que o controle biológico e ambiental apresentam efeitos de médio a longo prazo, não apenas do índice populacional dos moluscos, mas também de infecção humana. Além disso, já é comprovada a ineficácia dos controles biológicos sobre os moluscos. Já os métodos químicos apresentam resultados significantes a curto prazo. Desta forma, o controle de hospedeiros intermediários consiste em eliminar os focos de transmissão, dificultando a proliferação e o desenvolvimento dos caramujos, abrangendo o tratamento químico e respeitando a legislação ambiental vigente (BARBOSA et al., 2008; GOVERNO DE SÃO PAULO, 2007).

1.7 Moluscicidas no Controle de *Biomphalaria glabrata*.

Um composto moluscicida ideal deve eliminar os caramujos em todas as fases de seu ciclo de vida, desde a fase embrionária até a fase adulta. Deve apresentar baixo custo, ser

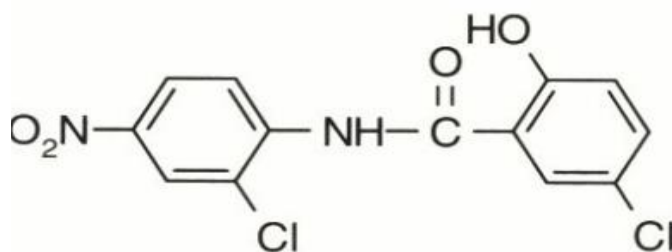
estável, de fácil transporte e aplicação, ausência de risco na manipulação, ser seletivo aos moluscos, inofensiva ao homem, animais não-alvo e plantas e não sofrer decomposição na água ou no solo (WHO, 1965, 1985; RAPADO, 2012).

Até a década de 70, vários produtos foram testados na tentativa de eliminar o os caramujos vetores da esquistossomose, como por exemplo a cal extinta, o sulfato de cobre, o pentaclorofenato de sódio, a tritilmorfolina e a niclosamida, todos estes comprovadamente tóxicos ao meio ambiente. No entanto, o único agente moluscicida utilizado em campanhas de controle nacional, tendo sua recomendação endossada pela OMS, é a niclosamida, produzida comercialmente pela Bayer (BARBOSA et al., 2008; WHO, 1965).

1.8 A Niclosamida

A niclosamida é o componente ativo contido em 25% na formulação do Bayluscide® EC 250, enquanto seu sal de etanolamina representa 70% da composição do Bayluscide® WP70, moluscicidas empregados no controle populacional de caramujos (embriões e animais adultos). Além de moluscicida, a niclosamida possui elevada toxicidade sobre helmintos da classe Cestoda e está contido nas preparações de Yomesan®, Mansonil® e Lintex®, utilizados na medicina humana e veterinária no tratamento da teníase. Trata-se de um sólido amarelado com peso molecular de 327,1 e fórmula química $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$ (2',5-dichloro-4'-nitrosalicylanilide) (Figura 8). É insípido e inodoro (ANDREWS et al., 1983).

Figura 8 – Estrutura química da niclosamida.



Fonte: ANVISA, disponível em www.portal.anvisa.gov.br (acesso em novembro de 2015).

Seu mecanismo de ação bioquímico é baseado no desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial em concentrações entre 10-100 nM, sendo quase 1000 vezes mais ativo que o 2,4-DNP, um xenobiótico utilizado na fabricação de tintas, herbicidas, pesticidas e explosivos. Assim como outros desacopladores, a niclosamida estimula a respiração mitocondrial em baixíssimas concentrações, porém inibe a respiração à medida que a concentração é aumentada. Em caramujos, a niclosamida estimulou o consumo de oxigênio em concentrações de 0,1 nM, sendo esta inibida em concentrações mais elevadas (HOLLINGWORTH et al., 2001).

A niclosamida (Bayluscide®) possui elevada toxicidade para moluscos na concentração 1 mg/L, causando 100% de mortalidade em 8 horas de exposição para os gêneros *Biomphalaria* e *Bulinus* (REY, 2001). Apesar de ser eficiente na eliminação dos moluscos em suas diferentes fases de desenvolvimento, apresenta desvantagens em sua utilização como a toxicidade elevada para espécies não-alvo, como peixes, plantas e outros organismos aquáticos em uso prolongado, possui custo elevado, se decompõe sob luz solar, é irritante para a pele e mucosas, além de não prevenir a recolonização em áreas tratadas (RAPADO, 2012; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; ABREU; GOULART; OLIVEIRA BRETT, 2002; ANDREWS et al., 1983; LOKER, 1990).

1.9 Moluscidas de Origem Natural

A dificuldade em controlar a esquistossomose associada aos altos custos e elevada toxicidade dos moluscidas sintéticos, bem como a busca por substâncias biodegradáveis e inócuas ao meio ambiente e ao homem, vem estimulado as pesquisas científicas direcionadas à descoberta de novos agentes moluscidas de origem natural (MARTINS et al., 2014; MIYASATO et al., 2012; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; ROCHA-FILHO et al., 2015).

A OMS reconhece como agente moluscida aqueles que apresentam acima de 90% de letalidade dos moluscos em concentrações iguais ou abaixo de 20 µg/mL em 24 horas, sendo um composto puro ou se apresentar 90% de letalidade em concentrações iguais ou abaixo de

100 µg/mL em 24 horas, quando forem extratos brutos. É ideal que a planta ou o produto natural seja autóctone da região endêmica, seja de fácil obtenção, com componentes bioativos baratos, de curto ciclo reprodutivo e biodegradáveis. O princípio ativo deve manter-se ativo sob alterações de pH, temperatura e luz solar (WHO, 1983; KLOOS; MCCULLOUGH, 1982).

A procura por moluscicidas de origem natural surgiu desde 1930, quando o cultivo de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), espécie típica do continente africano, foi sugerido próximo aos focos de transmissão da esquistossomose no Sudão. Observou-se que a presença dos frutos da árvore na água inibia a proliferação dos caramujos, dando início aos experimentos que comprovaram que, além dos frutos, as cascas, raízes e ramos possuíam propriedades letais sobre os caramujos. O componente ativo era, provavelmente, uma saponina, não sendo letal apenas para caramujos, mas também para miracídios, cercárias, peixes e girinos (ARCHIBALD et al., 1933; SILVA et al., 2008; GARDIOLI, 2014).

Mais de 42 compostos moluscicidas já foram isolados de diversas espécies vegetais e diversos estudos sugerem que a atividade tóxica dos agentes moluscicidas de origem vegetal está relacionada à presença de metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas, taninos, esteroides, dentre vários outros (WHO, 1983; LOPES et al., 2011; CANTANHEDE et al., 2010).

É importante ressaltar a necessidade de se compreender o mecanismo de ação dessas substâncias sobre os moluscos. O esclarecimento deste processo deve se dar através do estabelecimento dos detalhes referentes ao perfil fitoquímico do moluscicida, bem como da resposta fisiológica dos caramujos frente a esses constituintes químicos. Porém, apesar de diversas plantas terem sido testadas como possíveis agentes moluscicidas, pouco se sabe sobre seus metabólitos ativos. Comumente se encontram estudos com extratos brutos, sendo poucos os estudos com compostos isolados (CATANHEDE et al., 2010).

Outros compostos não vegetais também vem ganhando destaque como possíveis agentes moluscicidas, como é o caso de metabólitos produzidos por bactérias, fungos, esponjas e líquens. O pó liofilizado do caldo extracelular de uma cepa de *Aspergillus*

fumigatus obteve atividade moluscicida sobre a espécie *Oncomelania hupensis*, matando 100% dos caramujos a uma concentração de 48µg/mL (GUO et al., 2010). O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva conhecida por possuir um amplo complexo enzimático capaz de produzir cristais proteicos, conhecidos como δ -endotoxinas, citados na literatura por apresentarem atividade inseticida e moluscicida (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010; ALI et al., 2010). A halitoxina produzida pela esponja *Axinella viridis* foi testada sobre moluscos da espécie *B. glabrata*, demonstrando atividade tóxica sobre animais adultos (MIYASATO et al., 2012). A partir do ácido úsnico, metabólito liquênico extraído de *Cladonia substelata*, foi sintetizado o sal usnato de potássio, agente moluscicida efetivo sobre embriões e animais adultos da espécie *B. glabrata* em baixas concentrações (MARTINS et al., 2014).

1.10 Líquens

Líquens ou fungos liquenizados são organismos resultantes da associação simbiótica entre um fungo, geralmente um ascomiceto, e um fotobionte (BENATTI; MARCELLI, 2007). Os fungos formadores de líquens podem ser divididos em quatro filos: ascomicetos (98% de todas as espécies), basidiomicetos, deuteromicetos e mastigomicetos. Já os fotobiontes procariontes são distribuídos em 8 gêneros: *Nostoc*, *Gleocapsa*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Chroococcus*, *Hyella*, *Calothrix* e *Dichotrix*. As algas compreendem as *Chlorophyta*, *Xanthophyta* e *Phaeophyta* (PODTEROB, 2008).

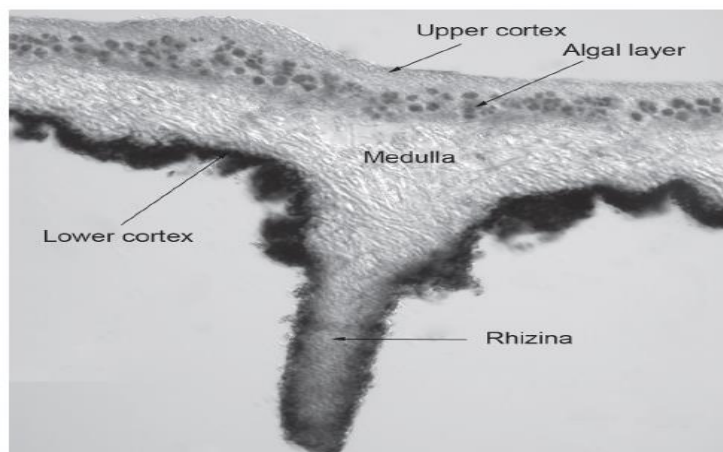
Estima-se que cerca de 18.500 espécies de líquens sejam conhecidas a partir de diversos substratos como solo, cascas de árvores, rochas, folhas, carapaças de animais e também em superfícies feitas pelo homem como madeira, couro, vidro, metal, concreto, argamassa, tijolo, borracha e plásticos (WANG; KRINGS; TAYLOR, 2010; MOLNÁR; FARKAS, 2010; BRIGHTMAN; SEAWARD, 1977; SEAWARD, 2008). Podem ser encontrados numa vasta gama de habitats, desde regiões árticas até desertos (TAYLOR et al., 1995).

A maioria dos líquens são terrestres, porém uma parcela menor pode estar presente em coleções de água doce e em ambiente marinho. São capazes de se adaptar a condições ambientais extremas como regiões de temperaturas secas, inundadas, com altos níveis de salinidade, concentrações elevadas de poluentes atmosféricos e ambientes pobres em nutrientes (NASH III, 2008). Em contraste com diversos tipos de fungos que se inserem no substrato onde vivem, os fungos liquenizados tendem a expor suas partes vegetativas na superfície do substrato, permitindo que o fotobionte receba a energia solar necessária à fotossíntese (MUGGIA; SCHMITT; GRUBE, 2009).

O metabolismo dos líquens se baseia na capacidade autotrófica dos fotobiontes e na heterotrofia do micobionte. Há um consenso geral de que a rede metabólica básica dos líquens é caracterizada pela fixação de CO₂ pelas algas verdes ou cianobactérias, fornecendo carboidratos que são transferidos para o micobionte como a fonte básica de carbono e energia (EISENREICH; KNISPEL; BECK, 2011). Além disso, processo de nutrição dos líquens também está ligado à disposição de água, seja por chuva, ocorrência de neblinas, nevoeiros, etc. Quando em contato com a água, os líquens absorvem os minerais depositados em seus talos (KAPPEN, 2000).

Existem dois princípios fundamentais relativos à organização do talo liquênico. Em talos homômeros, há pouca diferenciação entre as camadas ou estratos. A totalidade do talo é composto por uma massa frouxa de hifas fúngicas com células de algas, que são igualmente distribuídas ao longo do talo. Por outro lado, líquens com talos heterômeros são constituídos de até quatro camadas principais (Figura 9): (1) o córtex superior, que consiste em uma aglutinação de hifas fúngicas entrelaçadas, as quais fornecem proteção para a camada seguinte. (2) Camada gonidial ou de algas, formada pelo fotobionte. (3) A medula é formada por uma camada frouxa de hifas onde as trocas gasosas ocorrem. (4) Em alguns líquens, há uma zona cortical sob a medula, chamada de córtex inferior, a partir do qual as rizinas (estruturas de fixação) podem surgir (JAHNS, 1973; TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2014).

Figura 9 - Representação do talo liquênico.



Fonte: MOLNÁR; FARKAS, 2010.

Os líquens podem ser classificados quanto à morfologia de seu talo em múltiplos tipos, sendo as três principais classes: líquens crostosos, foliosos e fruticulosos (Figura 10). Líquens crostosos possuem crescimento particularmente lento, formando crostas diretamente ligadas ao substrato. Em vez de córtex inferior, eles geralmente tem uma medula que está em contato direto com o substrato. Os líquens foliosos possuem talos com lóbulos planos, lembrando às folhas de plantas. Estão fracamente ligadas ao substrato, algumas vezes através de rizinas. Crescem paralelamente à superfície, tendo, muitas vezes, as partes superiores e inferiores dos lóbulos cores diferentes. Já os líquens fruticulosos se assemelham à arbustos delicados, sendo suspensos, também, por um substrato (JAHNS, 1973; TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2014; NASH III, 2008).

Figura 10 – Tipos de talos liquênicos. (A) Líquen Crostoso. (B) Líquen Folioso. (C) Líquens Fruticoso.



CUNHA, E. Os líquens, disponível em: <http://esthercientista.blogspot.com.br/2011/06/os-liquens.html> (acesso em novembro de 2015).

Os líquens possuem alta afinidade com o seu habitat, servindo como bioindicadores da umidade do ar, pH do solo, demonstrando alta sensibilidade aos vários poluentes encontrados no meio ambiente (MOTA-FILHO et al., 2007). Diversos trabalhos reportam a utilização de espécies liquênicas visando o biomonitoramento ambiental em áreas impactadas por poluentes (PINHO et al., 2012; PAOLI et al., 2012; BRANQUINHO et al., 2011; YUN; WADLEIGH; MAYER, 2010).

A utilização dos líquens é diversa e antiga. Já foram relatadas suas utilizações para diversos fins como a nutrição de homens e animais, como corantes, remédios, perfumes, indicadores de pH, matéria prima para tecidos, dentre outras (MITROVIĆ et al., 2011). Diferentes gêneros de líquens são usados na cura de diversas doenças como febres, diarreia, doenças de pele, epilepsia, convulsões, asma, bronquite, inflamações, lepra, cálculos de vesícula, etc. (SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

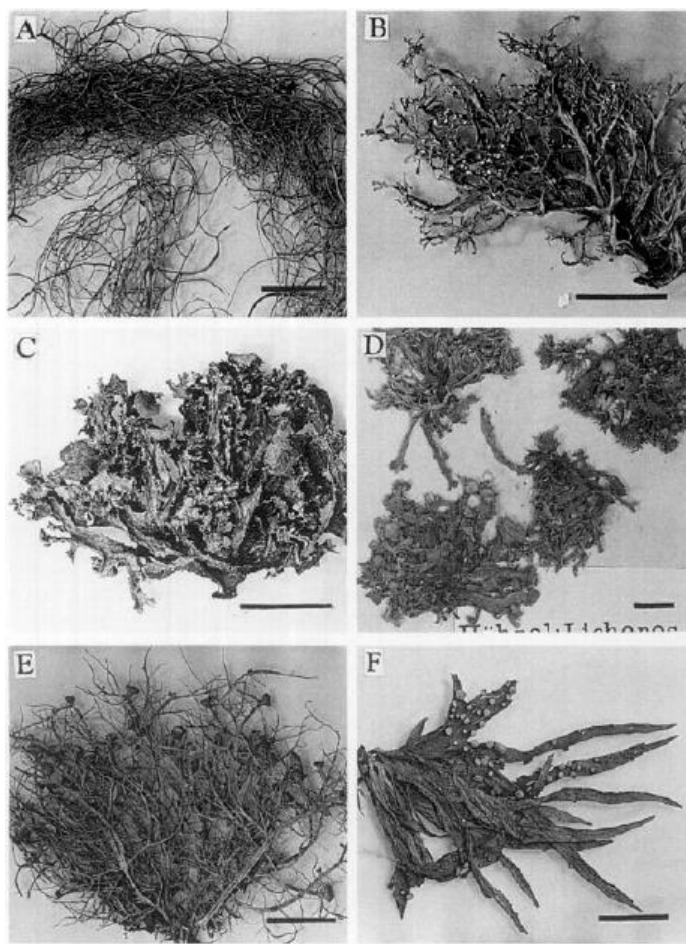
1.11 O Gênero *Ramalina*.

No gênero *Ramalina*, o talo é fruticoso e, em espécies brasileiras, seus comportamentos são comumente cespitoso (formando tufo densos e aglomerados), decubente (os ramos crescem horizontalmente no chão e as extremidades se colocam em posição vertical) e pendular (os quais se fixam no substrato e crescem pendurados). O talo é composto por ramificações que crescem a partir da base liquênica. Os ramos são, em grande parte, dorsiventrais ou cilíndricos. Ramos dorsiventrais, em sua grande maioria, possuem as superfícies dorsal e ventral bem distintas, geralmente apresentando diferença de coloração. Este tipo de talo é encontrado nas espécies *R. asahinae*, *R. aspera*, *R. cochlearis*, *R. complanata*, *R. grumosa*, *R. prolifera*, *R. puiggarii* e *R. subpollinaria*. Os ramos cilíndricos geralmente são circulares em corte transversal, sendo encontrados nas espécies de *R. solediosa* e alguns morfotipos de *R. sprengelli* ou *R. usnea* (KASHIWADANI; KALB, 1993).

Pseudocifelas são encontradas em todas as espécies brasileiras de *Ramalina* que possuem um talo sólido (Figura 11), sendo classificadas em elipsoides, tuberculares, linear curta e linear longa. As pseudocifelas elipsoides podem ser encontradas nas espécies de *R.*

asahinae, *R. cochlearis*, *R. dendroides*, *R. grumosa*, *R. prolifera*, *R. rigida*, *R. solediosa* e *R. subpollinaria*. Pseudocifelas tuberculadas, muitas vezes denominadas de “papilas”, são encontradas em *R. complanata* e *R. aspera*. Já as lineares curtas, também denominadas de fendas estreitas, possuem até 0,5 mm de largura e 1-3 mm de comprimento, sendo encontradas em *R. celastri* e *R. puiggarii*. E, por fim, as pseudocifelas lineares longas são formadas lateralmente e também denominadas de estrias brancas. São observadas nas espécies de *R. anceps*, *R. camptospora*, *R. dendroides*, *R. sprengelli* e *R. usnea* (KASHIWADANI; KALB, 1993).

Figura 11 – Diferenças morfológicas das espécies de *Ramalina* sp. (A) *Ramalina anceps*. (B) *Ramalina asahinae*. (C) *Ramalina aspera*. (D) *Ramalina aspera* (holótipo de *Ramalina denticulata* var. *stephanophora*). (E) *Ramalina camptospora*. (F) *Ramalina celastri*. Escala = 1 cm.



Fonte: KASHIWADANI; KALB, 1993.

Ascósporos em espécies líquênicas brasileiras de *Ramalina* são todos incolores, muitas vezes com 2 – 4 septos adicionais, sendo geralmente elipsoides ou fusiformes estreitos, também se observando os tipos fusiformes longos (*R. usnea*) ou sigmoides (*R. camptospora*) (KROG; SWINSCOW, 1974; KASHIWADANI; KALB, 1993).

Os sorédios das espécies brasileiras de *Ramalina* (*R. asahinae*, *R. cochlearis*, *R. dendriscoides*, *R. dendroides*, *R. grumosa*, *R. peruviana*, *R. rectangularis*, *R. rigida*, *R. solediosa* e *R. subpollinaria*) são granulares, possuindo de 30 a 50 µm de diâmetro. A presença de apotécio é bastante comum no gênero *Ramalina*, especialmente em espécies que não possuem a presença de propágulos assexuais. A localização dessas estruturas, bem como os tipos de esporos apresentam importância taxonômica. São classificados em subapicais (*R. camptospora*, *R. gracilis* e *R. pusiola*), laminais (*R. celastri*, *R. prolifera*), marginais (*R. asahinae*, *R. aspera*, *R. grumosa*, *R. puiggarii* e *R. usnea*) ou laterais (*R. sprengelii* e *R. usnea* de talo filamentoso) (KROG; JAMES, 1977; KROG; SWINSCOW, 1974, 1975; KASHIWADANI; KALB, 1993).

1.12 Metabólitos Líquênicos.

De forma geral, os metabólitos líquênicos podem ser divididos em dois grandes grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são as proteínas, lipídios, carboidratos e outros compostos orgânicos envolvidos no metabolismo e estruturas líquênicas. Os metabólitos secundários, também denominados de substâncias líquênicas, são produzidos majoritariamente pelo fungo e segregadas para a superfície das hifas dos líquens, quer na forma amorfa ou na forma de cristais (MITROVIĆ et al., 2011; HONDA; VILEGAS, 1999).

As diversas cores de várias espécies líquênicas resultam da acumulação massiva de seus metabólitos secundários, as quais podem compreender até 30% do peso seco do líquen. Esses metabólitos possuem química diversificada e baixo peso molecular. Cristais pigmentados são depositados extracelularmente ou nas camadas superficiais superiores do corpo vegetativo do líquen, enquanto substâncias incolores tendem a acumular em partes do

talo não exposto à luz solar. As estruturas de mais de 1000 substâncias liquênicas já foram reportadas (MUGGIA; SCHMITT; GRUBE, 2009; BACKOROVÁ et al., 2012; TURK et al., 2003; ELIX, 1996).

Os líquens possuem diversas vias biossintéticas para a produção de suas substâncias liquênicas, sendo as principais: via do acetato polimalonato, via do ácido chiquímico e via do ácido mevalônico. (1) Via do acetato polimalonato: Essa via produz, principalmente, os compostos pertencentes às classes dos depsídeos e depsidonas. Esses compostos são sintetizados pelo micobionte apenas quando este está em associação com a alga. Estes compostos desempenham um importante papel na associação simbiótica dos líquens. (2) Via do ácido chiquímico: As substâncias produzidas por esta via são, principalmente, o ácido pulvínico e as terpenilquinonas (ácidos aromáticos). Estes compostos são obtidos pela fusão de duas unidades de fenilpiruvato, sendo encontrados facilmente em líquens da família Stictaceae. (3) Via do ácido mevalônico: resulta, principalmente, na síntese de terpenóides. Sesquiterpenos não são bem reportados em líquens. Diterpenos também são raros. Triperpenos são abundantes em líquens, sendo já relatados 20 tipos diferentes obtidos de espécies liquênicas. A zeorina é o principal triterpeno (esteroide) encontrado nos líquens. Este grande espectro de substâncias está envolvido no papel protetor contra vários fatores físicos e biológicos (BOUSTIE; GRUBE, 2005; MITROVIĆ et al., 2011; MUGGIA; SCHMITT; GRUBE, 2009).

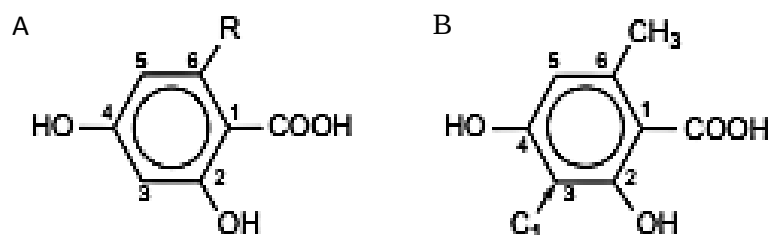
De acordo com a estrutura química, as substâncias liquênicas são majoritariamente classificadas como compostos fenólicos (derivados do orcinol e β -orcinol), dibenzofuranos (ex. ácido úsnico), depsídeos (ex. ácido barbático), depsidonas (ex. ácido salazínico), depsonas (ex. ácido picrolíquênico), lactonas (ex. protoliquesterínico), quinonas (ex. parietina) e derivados do ácido pulvínico (ex. ácido vulpínico) (SHUKLA; JOSHI; RAWAT, 2010).

1.13 Depsídeos e o Ácido Divaricático

Os compostos aromáticos presentes nos líquens são formados pela reação de esterificação entre duas ou três unidades fenólicas, como por exemplo, derivados do ácido orselínico, que é a unidade fundamental da biossíntese de depsídeos e depsidonas. Os depsídeos são formados pela esterificação de duas unidades fenólicas derivadas do orcinol (carboxila da posição 1 da primeira unidade com a hidroxila da posição 4' ou da posição 3' da segunda unidade), podendo resultar em compostos denominados *para*-depsídeos ou *meta*-depsídeos (HONDA; VILEGAS, 1999). No início, pensava-se que depsidonas eram formadas por meio de uma união oxidante direta entre 2 OH do anel A ou OH-5' carbono do anel B. Posteriormente, Culberson indicou que no processo de ciclização, uma ligação intramolecular do radical fenoxil com um radical arila podia levar à ligação éter da estrutura da depsidona. Outras sínteses químicas sugerem o envolvimento de múltiplos passos que levam à formação das depsidonas (STOCKER-WÖRGÖTTER; CORDEIRO; IACOMINI, 2013; CULBERSON, 1969).

Existem dois tipos diferentes de depsídeos e depsidonas, quer com um radical orcinol ou β -orcinol, dependendo da presença ou ausência de um átomo de carbono na posição 3 de seu anel romático. Por esta razão, depsídeos e depsidonas liquênicas são classificadas como pertencentes à série do orcinol ou β -orcinol (Figura 12) (STOCKER-WÖRGÖTTER; CORDEIRO; IACOMINI, 2013).

Figura 12 – Estrura do (A) orcinol e (B) β -orcinol.



Fonte: STOCKER-WÖRGÖTTER; CORDEIRO; IACOMINI, 2013

Diversos depsídeos já foram isolados de espécies do gênero *Ramalina* sp., dentre eles o ácido sequicáico, atranorina, ácido divaricático, ácido homosequicáico, ácido ramalinólico, ácido obtusático, tumidulina clorada, ácido 4'-O-metilsequicáico, ácido ervênico, ácido 4'-O-metilnorhomosequicáico, dentre outros (MOREIRA et al., 2015). O ácido divaricático, presente em 11 espécies do gênero *Ramalina*, dentre estas a *Ramalina aspera*, é citado na literatura por possuir atividade antitumoral sobre células cancerígenas de próstata, adenocarcinoma renal, adenocarcinoma de mama, melanoma, adenocarcinoma colorretal, carcinoma laríngeo e lipoma (RUSSO et al., 2012; BOGO, 2012), antimicrobiana (MOURA, 2008; RIBEIRO et al., 2002) e de inibição enzimática (SANKAWA et al., 1982).

Levando-se em consideração o alto potencial biológico, ainda pouco estudado, do ácido divaricático e a necessidade da busca de novos compostos moluscidas e cercaricidas biodegradáveis que possuam alta seletividade e baixa toxicidade, este estudo objetiva encontrar possíveis alternativas para o controle da esquistossomose através do combate ao seu hospedeiro intermediário e a fase larval do parasito, utilizando como objeto de estudo o ácido divaricático, substância natural encontrada em líquens oriundos de nosso território.

2 REFERÊNCIAS

- ABDUL-SALAM, J. M.; MICHELSON, E. H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Assay of factors influencing *in vitro* phagocytosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 52-59, 1980.
- ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; OLIVEIRA BRETT, A. M. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 913 – 919, 2002.
- ADENOWO, A. F.; OYINLOYE, B. E.; OGUNYINKA, B. I.; KAPPO, A. P. Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 196 – 205, 2015.
- ALI, B. A.; SALEM, H. H.; WANG, X. M.; HUANG, T. H.; XIE, Q. D.; ZHANG, X. Y. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. israelenses Endotoxin on the Intermediate Snail Host of *Schistosoma japonicum*. **Current Research in Bacteriology**, v. 3, p. 37 – 41, 2010.
- AMARAL, R. S.; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas**. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). Ministério da Saúde, 2008.
- AMEN, R. I.; BAGGEN, J. M. C.; BEZEMER, P. D.; JONG-BRINK, M. D. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitology**, v. 104, p. 33-40, 1992.
- ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The Biology and Toxicology of Molluscicides, Bayluscide®. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 245 – 295, 1983.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 945 – 958, 2010.
- ANVISA. Niclosamida. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/48467a80474596ac9eaade3fbc4c6735/n07.pdf?MOD=AJPERES> (acesso em novembro de 2015).

- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the controlo of schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 207 – 210, 1933.
- ATTWOOD, S. W.; UPATHAM, E. S. Observations on *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae) population densities in Thailand and central Laos: implications for the spread of Mekong schistosomiasis. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 126, 2012.
- BACKOROVÁ, M.; JENDZELOVSKY', R.; KELLO, M.; BACKOR, M.; MIKES, J.; FEDOROCKO, P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 462-468, 2012.
- BARBOSA, C. S.; FAVRE, T. C.; AMARAL, R. S.; PIERI, O. S. **Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansoni**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 965 – 1008, 2008.
- BARBOSA, C. S.; LEAL-NETO, O. B.; GOMES, E. C. S.; ARAÚJO, K. C. G. M.; DOMINGUES, A. L. C. The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 878 – 883, 2011.
- BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E. **Zoologia dos Invertebrados**. 6º ed. São Paulo: Roca, 1996.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 433 – 444, 2013.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 50, p. 409-416, 1980.

BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 863 – 878, 2007.

BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, p. 352-358, 2009.

BLANTON, R. E.; BARBOSA, L. M.; REIS, E. A.; CARMO, T. M.; SANTOS, C. R. A.; COSTA, J. M.; AMINU, P. T.; BLANK, W. A.; REIS, R. B.; GUIMARÃES, I. C.; SILVA, L. K.; REIS, M. G. The Relative Contribution of Immigration or Local Increase for Persistence of Urban Schistosomiasis in Salvador, Bahia, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0003521, 2015.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de líquens**. 110p. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

BOISSIER, J.; MONÉ, H.; MITTA, G.; BARGUES, M. D.; MOLYNEUX, D.; MAS-COMA, S. Schistosomiasis reaches Europe. **The Lancet**, v. 15, p. 757 – 758, 2015.

BOUSTIE, J.; GRUBE, M. Lichens – a promising source of bioactive secondary metabolites. **Plant Genetic Resources**, v. 3, p. 273 – 287, 2005.

BRANQUINHO, C.; MATOS, P. VIEIRA, A. R.; RAMOS, M. M. P. The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 84 – 92, 2011.

BRIGHTMAN, F. H.; SEAWARD, M. R. D. **Lichens of man-made substrates**. In: SEAWARD, M. R. D. Lichen Ecology. Academic Press, London, p. 253 – 293, 1977.

BRITO, G. Espécie do gênero *Biomphalaria*, vetor da esquistossomose. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1295&sid=32&tpl=printerview> (acesso em novembro de 2015).

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 163 – 176, 2009.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, 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, Recife, 2008.

CARDIM, L. B. **Caracterização das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município Lauro de Freitas, Bahia**. 100 f. Dissertação de Mestrado – Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

CARVALHO, O. S.; AMARAL, R. S.; DUTRA, L. V.; SCHOLTE, R. G. C.; GUERRA, M. A. M. **Distribuição Espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, Hospedeiros Intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 393 – 418, 2008.

- CAVALCANTI, M. G. S. **Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Shistosoma mansoni***. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2011.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 41 – 51, 2000.
- CIMERMAM, B.; CIMERMAM, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 216-219, 2001.
- COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, p. 2253 – 2264, 2014.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13 – 19, 2004.
- CULBERSON, C. F. **Chemical and botanical guide to lichen products**. The University of North Carolina Press: Chapel Hill. p. 348, 1969.
- CUNHA, E. Os líquens, disponível em: <http://esthercientista.blogspot.com.br/2011/06/os-liquens.html> (acesso em novembro de 2015).
- EISENREICH, W.; KNISPEL, N.; BECK, A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 445 – 456, 2011.
- ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 445 – 452, 2013.
- ELIX, J. A. **Biochemistry and secondary metabolites**. In: NASH III, T. H. Lichen Biology 1^a Ed. Cambridge University Press, Cambridge, p. 155 – 180, 1996.
- FAIRFAX, K.; NASCIMENTO, M.; HUANG, S. C.; EVERTS, B.; PEARCE, E. J. Th2 responses in schistosomiasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 863 – 871, 2012.

FAVRE, T. C.; PIERI, O. S.; BARBOSA, C. S.; BECK, L. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 569 – 576, 2001.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. **The Lancet Neurology**, v. 10, p. 853 – 864, 2011.

GARDIOLI, T. S. G. **Plantas do cerrado brasileiro como possíveis agentes moluscicidas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Porto Alegre, ES, 2014.

GOVERNO DE SÃO PAULO. **Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções**. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, São Paulo, 2007.

GRIMES, J. E. T.; CROLL, D.; HARRISON, W. E.; UTZINGER, J.; FREEMAN, M. C.; TEMPLETON, M. R. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasites & Vectors**, v.8, p. 1 – 16, 2015.

GRIMES, J. E. T.; CROLL, D.; HARRISON, W. E.; UTZINGER, J.; FREEMAN, M. C.; TEMPLETON, M. R. The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e3296, 2014.

GUO, D.; CHEN, J.; DU, X.; HAN, B. Screening of molluscicidal strain against *Oncomelania hupensis* from the rhizosphere of medicinal plant *Phytolacca acinosa* Roxb. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 159 – 165, 2010.

HOLLINGWORTH, R. M. **Inhibitors and uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation**. In: Krieger, R. I.; KRIEGER, W. C. Handbook of Pesticide Toxicology. Elsevier-Academic Press Inc., San Diego, CA. p. 1169 – 1261, 2001.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, p. 110 – 125, 1999.

- JAHNS, H. M. **Anatomy, Morphology, and Development**. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. *The Lichens*. Academic Press, Inc, Nova Iorque, p. 3 – 57, 1973.
- KAPPEN, L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. **Antarctic Science**, v. 12, p. 314 – 324, 2000.
- KASHIWADANI, H.; KALB, K. The genus *Ramalina* in Brazil. **Lichenologist**, v. 25, p. 1 – 31, 1993.
- KEALEY, A. Neglected Tropical Diseases: Infection, Modeling, and Control. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, p. 53 – 69, 2010.
- KLOOS, H.; McCULLOUGH, F. S. Plant Molluscicides. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 46, p. 195 – 209, 1982.
- KNAAP, V. W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanism in trematode-snail interaction. **Parasitology Today**, v. 6, p. 175 – 182, 1990.
- KROG, H.; JAMES, P. W. The genus *Ramalina* in Fennoscandia and the British Isles. **Norwegian Journal of Botany**, v. 24, p. 15 – 43, 1977.
- KROG, H.; SWINSCOW, T. D. V. *Ramalina* species with a hollow thallus (Fistularia) in East Africa. **Norwegian Journal of Botany**, v. 21, p. 111 – 124, 1974.
- KROG, H.; SWINSCOW, T. D. V. Some *Ramalina* species with punctiform pseudocyphellae in East Africa. **Norwegian Journal of Botany**, v. 22, p. 269 – 276, 1975.
- LEONARDO, L.; RIVERA, P.; SANIEL, O.; VILLACORTE, E.; LEBANAN, M. A.; CRISOSTOMO, B.; HERNANDEZ, L.; BAQUILOD, M.; ERCE, E.; MARTINEZ, R.; VELAYUDHAN, R. A National Baseline Prevalence Survey of Schistosomiasis in the Philippines Using Stratified Two-Step Systematic Cluster Sampling Design. **Journal of Tropical Medicine In Press**, p. 1 – 8, 2012.
- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 247 – 253, 2009.

LOKER, E. S. **Environmental Assessment. Use of the Molluscicide Bayluscide in a Pilot Program to Control Schistosomiasis in Kaele Division, Extreme North Province, Cameroon.** U. S. Agency for International Development, VBC Report No. 81133, 1990.

LOPES, T. C.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; ROSA, I. G. Avaliação Moluscicida e Perfil Fitoquímico das Folhas de *Caryocar Brasiliense* Camb. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 23 – 30, 2011.

MARTINS, M. C.; SILVA, M. C.; SILVA, L. R.; LIMA, V. L.; PEREIRA, E. C.; FALCÃO, E. P.; MELO, A. M.; DA SILVA, N. H. Usnic acid potassium salt: na alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Plos One**, v. 9, p. 111102, 2014.

MARTINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C. C.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; BEZERRA, F. S. M.; HEUKELBACH, J. Spatiotemporal Patterns of Schistosomiasis-Related Deaths, Brazil, 2000-2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1820 – 1823, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 200 – 202, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas.** Secretaria de Vigilância em Saúde. 4ª ed. Brasília, 2014.

MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V.; NIKOLIĆ, M.; TOŠIĆ, S.; STOJIČIĆ, D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. **Biologica Nyssana**, v. 2, p. 1 – 6, 2011.

MIYASATO, P. A.; KAWANO, T.; FREITAS, J. C.; BERLINCK, R. G. S.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 1873 – 1879, 2012.

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

MOORE, Janet. **Uma introdução aos invertebrados.** 1ª ed. São Paulo: Editora Santos, 2003.

MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos de compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2011.

MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. **Parasitology**, v. 120, p. 45 – 56, 2000.

MOREIRA, A. S. N.; BRAZ-FILHO, R.; MUSSI-DIAS, V.; VIEIRA, I. J. C. Chemistry and biological activity of Ramalina lichenized fungi. **Molecules**, v. 20, p. 8952 – 8987, 2015.

MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C.; LIMA, E. S.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. C. B. Influência de Poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, p. 1072 – 1076, 2007.

MOURA, M. C. G. G. **Atividade antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (Tuck.) Elix & Hale (Líquen)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

MUGGIA, L.; SCHMITT, I.; GRUBE, M. Lichens as treasure chests of natural products. **Sim News**, v. 59, p. 85 – 97, 2009.

NASCIMENTO, G. L.; OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, p. 29 – 36, 2013.

NASH III, T. H. **Lichen Biology**. 3^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NOYA, O.; KATZ, N.; POINTIER, J. P.; THERON, A.; NOYA, B. A. **Schistosomiasis in America**. In: FRANCO-PAREDES, C.; SANTOS-PRECIADO, J. I. Neglected Tropical Diseases – Latin America and the Caribbean. Springer-Verlag Wien, 2015. p. 11 – 43.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 342 – 350, 2000.

OTHMAN, A. A.; SOLIMAN, R. H. Schistosomiasis in Egypt: A never-ending story? **Acta Tropica**, v. 148, p. 179 – 190, 2015.

PALASIO, R. G. S.; CASOTTI, M. O.; RODRIGUES, T. C.; MENEZES, R. M. T.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; TUAN, R. The current distribution pattern of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* in the northern and southern regions of the coastal fluvial plain in the state of São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 15, p. e20140153, 2015.

PAOLI, L.; CORSINI, A.; BIGAGLI, V.; VANNINI, J.; BRUSCOLI, C.; LOPPI, S. Long-term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 70 – 75, 2012.

PARAENSE, W. L. A Survey of Planorbid Molluscs in the Amazonian Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 343 – 361, 1983.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 55, p. 105-128, 1975.

PEARCE, E. J.; MacDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499 – 511, 2002.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. ed. 11^a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2011.

PINHO, P.; BERGAMINI, A.; CARVALHO, P.; BRANQUINHO, C.; STOFER, S.; SCHEIDEGGER, C.; MÁGUAS, C. Lichen functional groups as ecological indicators of the effects of land-use in Mediterranean ecosystems. **Ecological Indicators**, v. 15, p. 36 – 42, 2012.

PODTEROB, A. P. Chemical composition of lichens and their medical applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, p. 582 – 588, 2008.

RAPADO, L. N. **Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de Piper em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2012.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E. C.; NICÁCIO, S.; FALCÃO, E. P.; GUSMÃO, N. B.; HONDA, N.; QUILHOT, W. **Mitteinlunger aus dem Institute für Allgemeline Botanic Hamburg**, v. 30 – 32, p. 187 – 194, 2002.

ROCHA-FILHO, C. A. A.; ALBUQUERQUE, L. P.; SILVA, L. R. S.; SILVA, P. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 132, p. 188 – 192, 2015.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control. Methods for use by individuals and communities**. World Health Organization, Geneva, 1997.

RUSSO, A.; CAGGIA, S.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; CARDILE, V. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, p. 1 – 10, 2012.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, p. 725-727, 2009.

SANKAWA, U.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; KINOSHITA, T.; IITAKA, Y. Depside as potente inhibitor of prostaglandin biosynthesis: A new active site model for fatty acid cyclooxygenase. **Prostaglandins**, v. 24, p. 21 – 34, 1982.

SCHOLTE, R. G. C.; CARVALHO, O. S.; MALONE, J. B.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, p. S95 – S101, 2012.

SEAWARD, M. R. D. Environmental role of lichens. In: NASH III, T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 274 – 278, 2008.

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

SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. **Filogenia, Co-Evolução, Aspectos Morfológicos e Biológicos nas Diferentes Fases de Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni***. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 43 – 84, 2008.

SILVA, N. F. S.; COGO, J.; WIEPIESKI, C. C. P.; LAVERDE JR. Bioensaio da atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 11, p. 179 – 181, 2008.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Epidemiologic Aspects of Hepatosplenic Schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, p. 327 – 336, 2011.

SOUZA, S. S. **A origem das células de defesa (hemócitos) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet**, v. 6, p. 411 – 425, 2006.

STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; CORDEIRO, L. M. C.; IACOMINI, M. **Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen**

symbionts. In: ATTA-UR-RAHMAN. *Studies in Natural Products Chemistry* 1^a Ed. Elsevier-Academic Press Inc., San Diego, CA. p. 337 – 380, 2013.

TAYLOR, T. N.; HASS, H.; REMY, W.; KERP, H. The oldest fossil lichen. **Nature**, v. 378, p. 224, 1995.

TAYLOR, T. N.; KRINGS, M.; TAYLOR, E. L. **Lichens**. In:_____. *Fossil Fungi*. 1^a Ed. Elsevier-Academic Press Inc., San Diego, CA. p. 201 – 220, 2014.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. **Implicações da Biologia de Biomphalaria no Controle da Esquistossomose**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 459 – 484, 2008.

TLAMÇANI, Z.; ER-RAMI, M. Schistosomiasis control: moroccan experience compared to other endemic countries. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 329 – 332, 2014.

TÜRK, A. O.; YILMAZ, M.; KIVANC, M.; TÜRK, H. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, p. 850 – 854, 2003.

VERRENGIA GUERRERO, N. R.; MOZZARELLI, M. N.; GIANCARLO, H.; NAHABEDIAN, D.; WIDER, E. *Biomphalaria glabrata*: Relevance of albino organisms as useful tool for environmental lead monitoring. **Bulletin of Environmental Contamination and toxicology**, v. 59, p. 822-827, 1997.

VIRMOND, M. C. L. Pesquisa em doenças negligenciadas: um desafio presente. **Salusvita**, v. 29, p. 3 – 5, 2010.

WANG, X.; KRINGS, M.; TAYLOR, T. N. A thalloid organism with possible lichen affinity from the Jurassic of Northeastern China. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 162, p. 591 – 598, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Molluscicide screening and evaluation**. Bulletin of the World Health Organization, v. 33, p. 567-581, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases, Hidden successes, Emerging opportunities**. World Health Organization, Geneva, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and Control of Schistosomiasis and soil-transmitted Helminthiasis: report of a WHO Expert Committee**. Geneva, 2002. (Technical report series, 912).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Scientific Working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicides**. Geneva, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis control. Report of a WHO Expert Committee**. Geneva, v. 515, p. 1-47, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Fact Sheet N° 115. Maio de 2015. [Acesso em 11 de dezembro de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/s115/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert Committee**. World Health Organ Technical Report Serie, v. 830, p. 1-86, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis**. World Health Organ Technical Report Serie, v. 728, p. 1-113, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert committee on bilharziasis: firstreport**. Geneva, 1953. (Technical report series, 53).

XU, J.; XU, J.; LI, S.; ZHANG, L.; WANG, Q.; ZHU, H.; ZHOU, X. Integrated control programmes for schistosomiasis and other helminth infections in P.R. China. **Acta Tropica**, v. 141, p. 332 – 341, 2015.

YOUNG, N. D.; JEX, A. R.; LI, B.; LIU, S.; YANG, L.; XIONG, Z.; LI, Y.; CANTACESSI, C.; HALL, R. S.; XU, X.; CHEN, F.; WU, X.; ZERLOTINI, A.; OLIVEIRA, G.;

HOFMANN, A.; ZHANG, G.; FANG, X.; KANG, Y.; CAMPBELL, B. E.; LOUKAS, A.; RANGANATHAN, S.; ROLLINSON, D.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P. J.; YANG, H.; WANG, J.; WANG, J.; GASSER, R. B. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. **Nature Genetics**, v. 44, p. 221 – 225, 2012.

YUN, M.; WADLEIGH, M. A.; MAYER, B. Variations of sulfur isotope ratios in a single lichen thallus: A potential historical archive for sulfur pollution. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3534 – 3538, 2010.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Obter o ácido divaricático a partir do líquen *Ramalina aspera* e avaliar seu efeito tóxico sobre *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*.

3.2 Específicos:

- Isolar e purificar o ácido divaricático a partir do líquen *R. aspera*.
- Caracterizar a substância purificada através de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia em Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1).
- Avaliar a atividade moluscicida do ácido divaricático utilizando bioensaios com moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*.
- Verificar a atividade embriotóxica do ácido divaricático sobre *Biomphalaria glabrata*.
- Avaliar a atividade cercaricida do ácido divaricático sobre *Schistosoma mansoni*.
- Avaliar a toxicidade ambiental do ácido divaricático através do bioensaio utilizando *Artemia salina*.

4 ARTIGO

Artigo: Divaricatic acid: Application of a lichen metabolite for the control of schistosomiasis.



Artigo a ser submetido ao periódico *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* no formato Original Research Article (FI: 4.381 ; QUALIS CB II: A2).

Divaricatic acid: Application of a lichen metabolite for the control of schistosomiasis.

Hianna A. M. F. Silva^a, Williams N. Siqueira^b, José L. F. Sá^a, Luanna R. S. Silva^c, Mônica C. B. Martins^a, André L. Aires^d, Francisco F. Amâncio^c, Eugênia. C. Pereira^e, Mônica C. P. A. Albuquerque^d, Ana M. M. A. Melo^c, Nicácio H. Silva^a.

^a Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^b Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^c Laboratório de Radiobiologia, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^d Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

^e Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Abstract

Background: In this study the molluscicidal and antiparasitic activity of divaricatic acid was evaluated, targeting the mollusc *Biomphalaria glabrata* and cercariae of the helminth *Schistosoma mansoni*. In addition, the environmental toxicity of divaricatic acid was assessed by bioassay using the microcrustacean *Artemia salina*, seeking an alternative treatment for the control of schistosomiasis.

Methods: For the evaluation of the molluscicidal effect of divaricatic acid, experiments were performed using embryos at the blastula stage and pigmented adult molluscs of the species *Biomphalaria glabrata*. Antiparasitic activity was assessed by exposing the cercariae of *Schistosoma mansoni* to divaricatic acid, while the environmental toxicity of divaricatic acid was evaluated using a bioassay with *Artemia salina*.

Results: Divaricatic acid showed high toxicity against both adult and embryonic snails. Similar activity was observed in *Schistosoma mansoni* cercariae after only a short exposure time. The toxicity of divaricatic acid on the parasite and snails was specific and did not show toxicity to the environment, as demonstrated in the acute toxicity test using *Artemia salina*.

Conclusion: Divaricatic acid proved to be a promising substance for the elimination of the snail *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of schistosomiasis, as well as the cercariae of the pathogen, while being non-toxic to the environment.

General significance: This is the first experimental observation of the molluscicidal activity of divaricatic acid and the first report of cercaricide activity in a substance derived from lichen.

1. Introduction

Schistosomiasis, also known as bilharzia, is a parasitic infectious disease caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*. Its transmission in humans begins with penetration by cercariae, the larval stage of the parasite, following contact of the skin with contaminated water [1,2]. In order for the parasite to complete its life-cycle, the presence of snails, its intermediate host, is required. Species of snails in three different genera are considered schistosomiasis vectors: *Biomphalaria*, *Bulinus* and *Oncomelania*. In the Americas and Africa, snails of the genus *Biomphalaria* are the intermediate hosts for *Schistosoma mansoni* [3,4].

The World Health Organization (WHO) estimates that at least 261 million people require treatment for schistosomiasis. The 78 countries where the disease is endemic are distributed between Africa, Asia and South America [2,5]. One of the strategies to combat schistosomiasis cited by the World Health Organization is the use of the synthetic molluscicide Niclosamide (Bayluscide, Bayer) [6]. However, the use of this substance has significant drawbacks: its high toxicity to non-target organisms and the high costs involved in its implementation [7,8,9]. Thus, there is the need for an alternative and several studies have aimed to identify molluscicides of natural origin to combat vector snails [10,11,12,13].

Lichens are symbiotic associations between mycobiont and photobiont organisms [14,15,16]. They are widely distributed around the globe, colonizing a variety of habitats from arctic to desert regions [17]. These organisms produce a variety of secondary metabolites known as lichenic substances, which are present inside the lichen thallus and sometimes form crystals on the surfaces of hyphae and algal cells. These substances may represent up to 30% of the dry weight of the stem, in some species [18 19]. These substances are produced by the mycobiont body [20], aiming not only to preserve the symbiotic structure, but also protect against pathogens and predators, intense UV radiation or oxidative stress [21]. Several studies have reported on the extensive biological and ecological potential of lichens and their secondary metabolites, such as antimicrobial, antioxidant, cytotoxic [22], antitumor [23], antifungal [24] activities. In addition, lichens are considered excellent bioindicators of environmental pollution [25].

Lichens produce a variety of metabolites, organized into different classes, such as depsides, depsidonas, dibenzofurans, xanthones, benzyl esters, anthraquinone, among others [26,27]. Depsides are compounds consisting of two or more phenolic aromatic rings joined by an ester linkage. They are mainly found in lichens, but can be isolated from some higher plants species [26,28]. Biological activities such as enzyme inhibition [29], antitumor [30] and antioxidant activities [31] have been observed in various depsides. Divaricatic acid belongs to the class of depsides and is commonly found in lichens of the genus *Ramalina*, yet is still rarely mentioned in the literature and its biological potential has remained unknown.

In this study, divaricatic acid, isolated from the lichen *Ramalina aspera*, has been tested against *B. glabrata*, a snail vector of schistosomiasis, in its embryonic and adult stages, as well as against *S. mansoni* cercariae. Concomitantly, its environmental toxicity was assessed using the microcrustacean *Artemia salina*.

2. Methodology

2.1 Collection of lichen material, preparation of ether extract and isolation of divaricatic acid.

Lichens of the species *R. aspera* were collected in the city of Limoeiro (Pernambuco, Brazil) and kept at room temperature ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$) under dry conditions for further identification and preparation of the extracts. Thallus identification was performed by M.Sc. Maria de Lourdes Buriel and a voucher specimen was deposited at the UFP Herbarium, Department of Botany of the Federal University of Pernambuco, Brazil (voucher n° 54299). Ten grams of lichen samples were subjected to successive extractions with diethyl ether in Soxhlet apparatus at 40°C . Subsequently, the solvent was evaporated at 55°C and the extract was kept in a desiccator for subsequent isolation of divaricatic acid.

Divaricatic acid was isolated by the crystallization method as described by Asahina and Shibata [32], with modifications. The ether extract of *R. aspera* was dissolved in 50 mL of chloroform and refluxed in a water bath at 40°C for 15 minutes. The concentrated material obtained was maintained at a temperature of $\pm 4^{\circ}\text{C}$ for 15 days until forming crystals, which were filtered out using a G4 porous bottom funnel. This procedure was repeated until obtaining crystals with purity exceeding 95%.

2.2 Chemical analysis

2.2.1 Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The crystals purified were subjected to rising chromatographic analysis (TLC), unidimensional, on silica gel 60 plates (Merk® PF₂₅₄₊₃₆₆) [33]. The elution system was performed in toluene / dioxane / acetic acid (45:12.5:2 - v/v/v) and revelation by spraying with 10% sulfuric acid with subsequent heating to 50°C for 5 minutes. Bands were observed using UV radiation (254 and 366 nm). To determine the purity of the sample was performed the HPLC analysis, using a Hitachi liquid chromatograph, coupled to a UV detector at 254 nm and a reversed phase column (RP 18). The sample was injected at a concentration of 1 mg/mL

in chloroform (Merk®). The mobile phase consisted of methanol / water / acetic acid (80:19.5:0.5 v/v/v) in isocratic system. The flow rate was 1.0 mL min⁻¹ [34].

2.2.2 ¹H Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) and Infrared (IR)

To confirm the molecular structure of divaricatic acid, ¹H NMR was performed using a Varian Unity Plus spectrometer at 300 MHz, 26°C, with DMSO-D6 as the solvent. The IR analysis was performed using a Bruker spectrophotometer coupled to a Fourier transformer (IF model 566) using KBr pellets. The analysis was performed at the Fundamental Chemistry Department of the Federal University of Pernambuco - UFPE, Brazil.

2.3 Bioassays

2.3.1 Source and maintenance of *Biomphalaria glabrata*

Pigmented adult snails of *B. glabrata* were used, measuring 10-14 mm of diameter, from São Lourenço da Mata, Pernambuco, and maintained for successive generations in the Radiobiology Laboratory of the Department of Biophysics and Radiobiology of UFPE. The animals were kept in plastic tanks of approximately 20L filtered and dechlorinated water, with pH 7.0 and a temperature of about 25 ± 3°C. The animals were fed daily with fresh, organic lettuce.

2.3.2 Embryotoxicity test in *Biomphalaria glabrata*

The assay was performed according to the methodology described by Oliveira-Filho and Paumgarten [7]. Egg masses were collected from breeding tanks, placed in Petri dishes (10 ml) and classified by embryonic stage with the aid of a stereomicroscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland). Five egg masses containing 100 embryos in the blastula stage were selected. The embryos were exposed to divaricatic acid in concentrations ranging from 7.5 to 20 µg/mL. Divaricatic acid was solubilized in 0.5% DMSO. The embryos were incubated for 6, 12, 18 and 24 hours and subsequently washed with filtered and dechlorinated water. Eight days after exposure, the embryos were analyzed for unviability (malformed embryos or dead). The negative control was formed by two groups of embryos exposed to filtered, dechlorinated water (Control 1) and 0.5% DMSO solution (Control 2). Niclosamide (Bayluscide, Bayer) was used for the positive control, at a concentration of 1 µg/mL. Assays were performed in triplicate for each concentration.

2.3.3 Lethality test in *Biomphalaria glabrata*

Adult snails of *B. glabrata* were pre-selected as to their sexual maturity through the position of egg masses. Sexually mature snails were separated into groups of 10 specimens and kept in containers containing 60 mL of divaricatic acid solution dissolved in 0.5% DMSO at concentrations of 2.5, 3.5, 4.5 and 5.5 µg/mL. The snails were incubated for 24 hours and subsequently were washed with filtered and dechlorinated water. Eight days after exposure, they were analyzed for lethality (absence of body movement, decrease in body weight with load $\leq 1/2$ of the shell, loss of hemolymph and absence of heartbeat). The negative control was formed of two groups of snails exposed to filtered and dechlorinated water (Control 1) and 0.5% DMSO solution (Control 2). Niclosamide (Bayluscide, Bayer) was used for the positive control, at a concentration of 1 µg/mL. The assay was performed in triplicate.

2.3.4 Lethality test on *Schistosoma mansoni* cercariae

B. glabrata infected with *S. mansoni* (Belo Horizonte strain) were exposed to artificial light for release of cercariae. A suspension of approximately 100 cercariae was kept in a glass container and exposed to divaricatic acid at concentrations of 0.5, 1.0, 10 and 100 µg/mL. The divaricatic acid was solubilized in 0.5% DMSO. The negative control was formed of two groups exposed to filtered and dechlorinated water (Control 1) and 0.5% DMSO solution (Control 2). Niclosamide (Bayluscide, Bayer) was used for the positive control, at a concentration of 1 µg/mL. The assay was performed in triplicate. The lethality of cercariae was observed 15, 30, 60 and 120 minutes after exposure to divaricatic acid with the aid of a stereomicroscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland). The following criteria were used: total elimination of cercariae (+++), elimination higher than 50% of cercariae (++), less than 50% elimination of cercariae (+) and absence of lethality (-).

2.3.5 Evaluation of environmental toxicity by bioassay with *Artemia salina*

Artemia salina cysts were placed in a beaker containing 500 mL of filtered, natural seawater (pH = 8.0) under constant aeration at a temperature of 25°C. After 48 hours, hatching of the cysts and release of nauplii were observed. Subsequently, they were placed in a tube assay containing 5 mL of divaricatic acid solutions at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL, in groups of 10 specimens. The negative control comprised two groups of *A. salina* exposed to filtered, natural seawater (Control 1) and a solution of 0.5% DMSO in seawater (Control 2). Exposure of *A. salina* to divaricatic acid was performed for 24 hours and, thereafter, mortality was assessed using a stereomicroscope.

2.4 Statistical analysis

Significant differences were identified using ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls post-test, where $p < 0.05$ was considered significant for all analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The estimated lethal concentrations for 10, 50 and 90% of the specimens (LC_{10} , LC_{50} and LC_{90}) were performed by Probit analysis with a 95% confidence interval, using the StatPlus® 2009 Professional software (AnalystSoft, Canada).

3. Results

3.1 Chemical analysis

The TLC analysis of the sample after the purification process showed the presence of a single band with a retention factor of 0.39, a result consistent with the findings of Huneck and Yoshimura, 1996 [34]. Confirmation of substance isolation was performed using HPLC (Figure 1), where the crystals showed 97.45% purity and a retention factor of 12.70. The 1H NMR and IR analyses confirmed the chemical structure of the purified divaricatic acid (Figure 2), resulting in the following data: 1H NMR (DMSO – d_6 , 300 MHz) δ : 0.88, 0.91 (2 x 3H, 2 x T, $J = 8.1$ Hz, Me-3'', Me-3'''); 1.51 – 1.62 (4H, m, -CH₂-2'', -CH₂-2'''); 2.50, 2.61 (2 x 2H, 2 x T, $J = 8.0$ Hz, -CH₂-1'', -CH₂-1'''); 3.33 (1 x 3H, s, MeO-4); 6.35, 6.36 (2 x 1H, 2 x d, $J = 7.0$ Hz, H-3', H-5'); 6.50, 6.58 (2 x 1H, 2 x d, $J = 7.0$, H-3, H-5); 10.23 (2 x 1H, s, -C-OH-2', -C-OH-2). IR (KBr): 2955, 2872, 1670, 1646, 1609, 1545, 1305, 1284, 1242, 1202, 1155, 1139 cm^{-1} .

3.2 Toxicity in embryos and adult snails of *Biomphalaria glabrata* exposed to divaricatic acid

The findings of embryotoxic activity, at different exposure times, of divaricatic acid on *B. glabrata* are described in Table 1. All exposure intervals (6, 12, 18 and 24 hours) showed significant values of unviable embryos. In Figure 3, embryonic alterations caused by divaricatic acid can be seen. In addition to the observed lethality (Figure 3-C and 3-E), the presence of abnormalities was found (shell malformations, hydropic embryos and nonspecific malformations) as well as a delay in embryonic development, with several embryos not breaking out (Figure 3-B, 3-C, 3-D).

Exposure for 24 hours showed the highest unviability, showing significant values starting from a concentration of 8 $\mu g/mL$ ($p < 0.05$), reaching 100% unviability at the 15 $\mu g/mL$ concentration. At the other exposure times, 100% of unviability was achieved at a

concentration of 20 µg/mL. The LC₅₀ for *B. glabrata* embryos at all tested time intervals are shown in Table 2, with values of 13.34, 11.60, 10.54, and 10.29 µg/mL at exposures of 6, 12, 18 and 24 h, respectively, where a decrease in LC₅₀ is observed as the exposure time is increased.

The molluscicidal effect on adult snails is shown in Figure 4, where significant mortality was observed at all tested concentrations. The results were 26.66% ($p < 0.5$), 40% ($p < 0.01$), 76.66% ($p < 0.001$) and 100% ($p < 0.001$) for the concentrations of 2.5, 3.5, 4.5 and 5.5 µg/mL, respectively. The lethal concentrations obtained were 1.68, 3.58 and 5.49 µg/mL for the LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀, respectively.

3.2 Activity of divaricatic acid on *Schistosoma mansoni* cercariae

Table 3 shows the mortality of cercariae exposed to divaricatic acid in relation to exposure time. Lethal effects started after 60 min of exposure at a concentration of 0.5 µg/mL, reaching 100% of mortality at 15 and 30 min at concentrations of 100 and 10 µg/mL, respectively. At these concentrations, it was possible to observe separation of tail and body of cercariae, as shown in Figure 5 (B - C). Also, changes in cercariae motility were observed at all concentrations, with atypical movement, such as slow rotation and vibration, rotation on its own axis, a type of creeping dislocation and contraction of the cercariae body with varying intensity. These observations were dependent on exposure time and concentration. The cercariae of control groups 1 and 2 had normal movements of swimming by rotation and vibration, with preservation of the body and tail (Figure 5-A). Cercariae exposed to Niclosamide showed 100% lethality after just one minute of exposure (Figure 5-D).

In Figure 6, the graph displays the mortality of exposed cercariae to divaricatic acid at the end of exposure time (120 minutes), in which it is observed that all concentrations showed significant mortality compared with control 2, with values of 23.33% ($p < 0.01$) 56% ($p < 0.001$) 70% ($p < 0.001$), 100% ($p < 0.001$) and 100% ($p < 0.001$) at the concentrations of 0.5, 1, 5, 10 and 100 µg/mL, respectively, exhibiting an LC₅₀ of 0.89 µg/mL.

3.3 Environmental toxicity of divaricatic acid

The evaluation of environmental toxicity of divaricatic acid using the *A. salina* bioassay (Table 4) showed low toxicity at all concentrations tested. Among which, only the concentration of 400 µg/mL showed statistically significant results in relation to control 2 ($p < 0.001$).

4. Discussion

Although there have been no reports of molluscicidal activity in the lichen genus *Ramalina* or its metabolites, several biological activities of this genus are reported in the literature, as well as their derivatives in different organisms. The hexane extract of lichen *R. roesleri* Nyl has shown high antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* [35]. The antiviral activity of *R. farinacea* on the respiratory syncytial and herpes simplex viruses has been observed by Esimone et al. [36]. Similar results have been obtained by Lai et al. [37], who studied the antiviral activity of phenolic compounds derived from *R. farinacea* and confirmed its inhibitory effects on the respiratory syncytial virus. Antioxidant activity of Ramalin, a non-toxic, antioxidant compound extracted from *R. terebrata*, has been shown [38], where elimination of free radicals has been observed at higher rates than with commercial antioxidants. Bézivin et al. [39] have demonstrated the antitumor activity of *R. cuspidata* on different cancer cell lines, while Byeon et al. [40] have evaluated the anti-inflammatory activity of the compound Stereocalpin A isolated from *R. terebrata*.

According to the World Health Organization (1983), molluscicidal activity of an isolated plant compound is recognized when it causes 90% mortality at concentrations equal to or below 20 µg/mL in 24 hours of exposure [41]. The results in Table 1 show that divaricatic acid falls within the parameters established by the WHO, showing embryotoxic activity above 90% against *B. glabrata* embryos from a concentration of 15 µg/mL at exposures of 24, 18 and 12 hours and from 20 µg/mL at 6 hours of exposure. Similar results were observed with lichen salt, potassium usnate, which presented embryotoxic effects, showing 100% lethality against *B. glabrata* embryos at a concentration of 10 µg/mL [42]. Another study has found similar results following embryotoxic evaluation of an amide derivative, pirlatine, of *Piper tuberculatum*, which showed 100% embryotoxic activity against *B. glabrata* embryos at a concentration of 20 µg/mL [5]. Lima et al. [43] have obtained significant results when testing lapachol, isolapachol and their salts against *B. glabrata* embryos, where lapachol salt had the greatest LC₅₀ at 2,448 µg/mL. Other natural compounds such as *Microgramma vacciniifolia* lectin and the CH₂Cl₂ fraction of *Liagora farinosa* extract had low activity compared to other compounds [10,44]. The malformations shown in Figure 1 have also been observed in *B. glabrata* embryos in other, similar studies [10,45,46].

The evaluation of molluscicidal activity of divaricatic acid on adult *B. glabrata* snails, shown in Figure 4, revealed significant results with 100% mortality of specimens at low concentration (5.5 µg/mL) when compared to other studies reported in the literature [13,47,11]. Mechanisms of action of various molluscicides are not well established, but some studies have reported on changes in the digestive system of snails, with possible changes in the dimensions of cells, apical membrane rupture, vacuolization, cytoplasmic fragmentation

and degeneration of tissues [48,49]. Changes in the reproductive system [48,49] and in the tegument [50] have also been reported.

A single miracidium after penetrating a snail can lead through asexual reproduction to the formation of a sporocyst, containing thousands of cercariae [3], which are released into the water under specific endogenous and environmental conditions [51]. Thus, it is interesting to note the relationship between the concentrations that presented molluscicidal activity against adult *B. glabrata* snails and cercaricide of *S. mansoni* in this work, emphasizing the importance of molluscicides that have biological activity concomitantly against these two species. Divaricatic acid, as shown in Table 3, is lethal to 100% of cercariae at a concentration of 10 µg/mL, in 30 min, contributing to the elimination of the vector snail and parasite that causes schistosomiasis at the same concentration. No data on cercaricide activity using lichen metabolites has been found in the literature, however other plant products have shown similar activity [43], where molluscicidal and cercaricide activity of lapachol and isolapachol salt were effective at low concentrations. However, the *in vitro* efficacy of the essential oil extracted from *Piper cubeba* L. against *S. mansoni* cercariae showed activity at higher concentrations, reaching 200 µg/mL [52], showing that the data for divaricatic acid obtained in this work indicated more efficient molluscicide activity.

Environmental toxicity tests are commonly performed using a model organism such as fish and invertebrates. Among these organisms, *A. salina* stands out, with its use reported in several studies [53,54,55]. The toxicity of extracts of *R. farinacea* on *A. salina* were evaluated, and low LC₅₀ values were observed for ethanol, chloroform and n-hexane extracts, which ranged from 6.0 to 11.3 µg/mL. Only the aqueous extract of *R. farinacea* had a high LC₅₀, at 206.9 µg/mL [56]. Martins et al. [42], when conducting a bioassay with *A. salina* to test the lichen salt, potassium usnate, obtained significant values of mortality at concentrations between 5 and 10 µg/mL, showing potassium usnate is safe to use at low concentrations. The data obtained suggest that divaricatic acid had no significant environmental toxicity (Table 4), and can be used without appreciable environmental damage up to a concentration of 400 µg/mL.

5. Conclusion

The results of this study are relevant for the control of schistosomiasis, as divaricatic acid has been shown to be a biological tool of high potential in combating the parasite vector in its embryonic and adult stages, as well as being effective against the cercarial form of the causative agent of the disease, while not being environmentally toxic. In this sense, future studies should be conducted in order to evaluate the courses of action for this lichen substance and the use of testing in the field.

6. References

- [1] B. Gryssels, , K. Polman, J. Clerinx, , L. Kestens, Human schistosomiasis. *Lancet*. 368 (2006) 1106–1118. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)
- [2] World Health Organization, 2015. Fact sheet 115. World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> (accessed July 04, 2015).
- [3] D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis. *Lancet*. 383 (2014) 2253-2264. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)
- [4] World Health Organization, 1988. Environmental Management for Vector Control: Training and informational materials. Slides set series. World Health Organization, Geneva.
- [5] L.N. Rapado, A.S. Pinheiro, P.O.M.V. Lopes, H.H. Fokoue, M.T. Scotti, J.V. Marques, F.P. Ohlweiler, S.I. Borrelly, C.A.B. Pereira, M.J. Kato, E. Nakano, L.F. Yamaguchi, Schistosomiasis Control Using Pirplatine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2251. [doi: 10.1371/journal.pntd.0002251](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002251)
- [6] World Health Organization, 1965. Molluscicide screening and evaluation. Bulletin of the World Health Organization, Geneva.
- [7] E.C. Oliveira-Filho, F.J.R. Paumgarten, Toxicity of *Euphorbia milli* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46 (2000) 342-350. [doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.038](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.038)
- [8] P. Andrews, J. Thyssen, D. Lorke, The biology and toxicology of molluscicides, bayluscide. *Pharmacol. Ther.* 19 (1982) 245-295. [doi:10.1016/0163-7258\(82\)90064-X](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90064-X)
- [9] F.C. Abreu, M.O.F Goulart, A.M. Oliveira Brett, Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an eletrochemical DNA-biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 913-919. [doi:10.1016/S0956-5663\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00082-9)
- [10] L.P. Albuquerque, E.V. Pontual, G.M.S. Santana, L.R.S Silva, J.S. Aguiar, L.C.B.B. Coelho, M.J.B.M. Rêgo, M.G.R. Pitta, T.G. Silva, A.M.M.A. Melo, T.H. Napoleão, P.M.G.

- Paiva, Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* 138 (2014) 23-27. doi: [10.1016/j.actatropica.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.005)
- [11] C.A.A. Rocha-Filho, L.P. Albuquerque, L.R.S. Silva, P.C.B. Silva, L.C.C.B. Coelho, D.M.A.F. Navarro, M.C.P.A. Albuquerque, A.M.M.A. Melo, T.H. Napoleão, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, Assessment of toxicity of *Moringa oleífera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere.* 132 (2015) 188-192. doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.03.041](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.041)
- [12] S.C. Yadav, M.V. Jagannadham, Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalariaa glabrata*. *Chemosphere.* 71 (2008) 1295-1300. doi: [10.1016/j.chemosphere.2007.11.068](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.068)
- [13] A.F. Santos, B.S. Cavada, B.A.M. Rocha, K.S. Nascimento, A.E.G. Sant'Ana, Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 794-798. doi: [10.1016/j.biortech.2009.07.062](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.062)
- [14] S. Vatne, J. Asplund, Y. Gauslaa, Contents of carbon based defence compounds in the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* vary along environmental gradients. *Fungal Ecol.* 4 (2011) 350-355. doi: [10.1016/j.funeco.2011.03.007](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.03.007)
- [15] H. Turkes, E. Aydin, A. Aslan, *Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes. *Cytotechnology.* 64 (2012) 679-686. doi: [10.1007/s10616-012-9447-0](https://doi.org/10.1007/s10616-012-9447-0)
- [16] T. Mitrović, S. Stamenković, V. Cvetković, M. Nikolić, S. Tosić, D. Stojicić, Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Journal of Biological Sciences.* 2 (2011) 1-6.
- [17] T.N. Taylor, H. Hass, W. Remy, H. Kerp, The oldest fossil lichen. *Nature.* 378 (1995) 244. doi: [10.1038/378244a0](https://doi.org/10.1038/378244a0)

- [18] M. Backorová, R. Jendzelovsky, M. Kello, M. Backor, J. Mikes, P. Fedorocko, Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. in Vitro.* 26 (2012) 462-468. [doi: 10.1016/j.tiv.2012.01.017](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.017)
- [19] B. Ranković, M. Misić, The Antimicrobial Activity of the Lichen Substances of the Lichens *Cladonia Furcata*, *Ochrolechia Androgyna*, *Parmelia Caperata* and *Parmelia Conspresa*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 22 (2014) 1013-1016. [doi:10.1080/13102818.2008.10817601](https://doi.org/10.1080/13102818.2008.10817601)
- [20] V. Shukla, D.K. Upreti, R. Bajpai, *Lichens to Biomonitor the Environment*. Ed. Springer Science & Business Media. Edição Revisada. (2013) p. 22.
- [21] S.K. Oettl, J. Hubert, J.M. Nuzillard, H. Stuppner, J.H. Renault, J.M. Rollinger, Dereplication of depsides from the lichen *Pseudevernia furfuracea* by centrifugal partition chromatography combined to ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition. *Anal. Chim. Acta.* 846 (2014) 60-67. [doi: 10.1016/j.aca.2014.07.009](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.009)
- [22] N. Manojlović, B. Ranković, M. Kosanić, P. Vasiljević, T. Stanojković, Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine.* 19 (2012) 1166-1172. [doi: 10.1016/j.phymed.2012.07.012](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012)
- [23] A. Russo, S. Caggia, M. Piovano, J. Garbarino, V. Cardile, Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. *Chem. Biol. Interact.* 195 (2012) 1-10. [doi: 10.1016/j.cbi.2011.10.005](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.10.005)
- [24] S.K. Shahi, A.C. Shukla, A. Dikshit, D.K. Upreti, Broad spectrum antifungal properties of the lichen *Heterodermia leucomela*. *Lichenologist.* 33 (2001) 177-179. [doi: 10.1006/lich.2000.0303](https://doi.org/10.1006/lich.2000.0303)
- [25] S. Grangeon, S. Guédron, J. Asta, G. Sarret, L. Charlet, Lichen and soil as indicators of an atmospheric mercury contamination in the vicinity of a chlor-alkali plant (Grenoble, France). *Ecol Indic.* 13 (2012) 178-183. [doi:10.1016/j.ecolind.2011.05.024](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.05.024)

- [26] N. K. Honda, W. Vilegas, A Química dos Líquens. Quim. Nova. 21 (1998) 110-125. doi: [10.1590/S0100-40421999000100018](https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000100018)
- [27] P. Bellio, B. Segatore, A. Mancini, L. Di Pietro, C. Bottoni, A. Sabatini, F. Brisdelli, M. Piovano, M. Nicoletti, G. Amicosante, M. Perilli, G. Celenza, Interaction between lichen secondary metabolites and antibiotics against clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Phytomedicine. 22 (2015) 223-230. doi: [10.1016/j.phymed.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.005)
- [28] L. Peng-Cheng, X. Zhu-Ping, F. Rui-Qin, L. Huan-Qiu, Z. Hai-Liang, L. Chang-Hong, Synthesis, characterization and structure – activity relationship analysis of novel depsides as potential antibacterials. Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1779-1787. doi: [10.1016/j.ejmech.2008.04.019](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.04.019)
- [29] K. Umezawa, S. Muramatsu, M. Ishizuka, T. Sawa, T. Takeuchi, T. Matsushima, Inhibition of histidine decarboxylase and tumor promoter-induced arachidonic acid release by lecanoric acid analogues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 110 (1983) 733-739. doi: [10.1016/0006-291x\(83\)91022-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(83)91022-7)
- [30] M. Backorová, M. Backor, J. Mikes, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. Toxicol. in Vitro. 25 (2011) 37-44. doi: [10.1016/j.tiv.2010.09.004](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.004)
- [31] H. Luo, Y. Yamamoto, J.A. Kim, J.S. Jung, Y.J Koh, J.S. Hur, Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). Polar Biol. 32 (2009) 1033-1040. doi: [10.1007/s00300-009-0602-9](https://doi.org/10.1007/s00300-009-0602-9)
- [32] Y. Asahina, S. Shibata, Chemistry of lichen substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokio. (1954)
- [33] C. F. Culberson, Chemical and botanical guide to lichen products. The University of North Carolina Press: Chapel Hill. (1969)

- [34] S. Huneck, I. Yoshimura, Identification of Lichen Substances. Springer, Berlin. (1996)
[doi: 10.1007/978-3-642-85243-5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5)
- [35] R. Sisodia, M. Geol, S. Verma, A. Rani, P. Dureja, Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. Nat. Prod. Res. 27 (2013) 2235-2239. [doi: 10.1080/14786419.2013.811410](https://doi.org/10.1080/14786419.2013.811410)
- [36] C.O. Esimone, T. Grunwald, C.S. Nworu, S. Kuate, P. Proksch, K. Ueberla, Broad spectrum antiviral fractions from the lichen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. Chemotheraphy. 55 (2009) 119-126. [doi: 10.1159/000194974](https://doi.org/10.1159/000194974)
- [37] D. Lai, D.C. Odimegwu, C. Esimone, T. Grunwald, P. Proksch, Phenolic Compounds with In Vitro Activity against Respiratory Syncytial Virus from the Nigerian Lichen *Ramalina farinacea*. Planta Med. 79 (2013) 1440-1446. [doi: 10.1055/s-0033-1350711](https://doi.org/10.1055/s-0033-1350711)
- [38] B. Paudel, H.D. Bhattarai, H.Y. Koh, S.G. Lee, S.J. Han, H.K. Lee, H. Oh, H. H.W. Shin, J.H. Yim, Ramalin, a novel nontoxic antioxidant compound from the Antartic lichen *Ramalina terebrata*. Phytomedicine. 18 (2011) 1285-1290. [doi: 10.1016/j.phymed.2011.06.007](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.007)
- [39] C. Bézivin, S. Tomasi, F.L.L. Dévéhat, J. Boustie, Cytotoxic activity os some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine. 10 (2003) 499-503. [doi: 10.1078/094471103322331458](https://doi.org/10.1078/094471103322331458)
- [40] H.E. Byeon, B.K. Park, J.H. Yim, H.K. Lee, E.Y. Moon, D.K. Rhee, S. Pyo, Stereocalpin A inhibits the expression of adhesion molecules in activated vascular smooth muscle cells. Int. Immunopharmacol. 12 (2012) 315-325. [doi: 10.1016/j.intimp.2011.11.020](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.11.020)
- [41] World Health Organization, 1983. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva.
- [42] M.C.B. Martins, M.C. Silva, L.R.S. Silva, V.L.M. Lima, E.C. Pereira, E.P.S. Falcão, A.M.M.A. Melo, N.H. Silva, Usnic Acid Potassium Salt: Na Alternative for the Controlo of

Biomphalaria glabrata (Say, 1818). Plos One. 9 (2014) e111102. [doi: 10.1371/journal.pone.0111102](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111102)

[43] N.M.F. Lima, A.F. Santos, Z. Porfírio, M.O.F. Goulart, A.E.G Sant'Ana, Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop. 83 (2002) 43-47. [doi: 10.1016/s0001-706x\(02\)00055-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00055-4)

[44] P.A. Miyasato, T. Kawano, J.C. Freitas, R.G.S. Berlinck, E. Nakano, L.F. Tallarico, Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). Parasitol. Res. 110 (2012) 1873-1879. [doi: 10.1007/s00436-011-2712-x](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2712-x)

[45] L.F. Tallarico, S.I. Borrelly, N. Hamada, V.S. Grazeffe, F.P. Ohlweiler, K. Okazaki, A.T. Granatelli, I.W. Pereira, C.A.B. Pereira, E. Nakano, Developmental toxicity, acute toxicity, and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. Ecotoxicol. Environ. Saf. 110 (2014) 208-215. [doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.005)

[46] E.C. Oliveira-Filho, B.R. Geraldino, D.R. Coelho, R.R. De-Carvalho, F.J.R. Paumgarten, Comparative toxicity of *Euphorbia milli* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere. 81 (2010) 218-227. [doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.038](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.038)

[47] M.F. El Sherhy, R.H. Swellem, S.M. Abu-Bakr, E.M. El-Telbani, Synthesis and molluscicidal evaluation of some new pyrazole, isoxazole, pyridine, pyrimidine, 1,4-thiazine and 1,3,4-thiadiazine derivatives incorporating benzofuran moiety. Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 4783-4787. [doi: 10.1016/j.ejmech.2010.07.043](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.043)

[48] M.Z. Rizk, N.S. Metwally, M.A. Hamed, A.M. Mohamed, Correlation between steroid sex hormones, egg laying capacity and cercarial shedding in *Biomphalaria alexandrina* snails after treatment with *Haplophyllum tuberculatum*. Exp. Parasitol. 132 (2012) 171-179. [doi: 10.1016/j.exppara.2012.06.011](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.011)

- [49] A.A.A. Yousef, N.B. El-Kassas, Ultrastructure and histopathological effects of some plant extracts on digestive gland of *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. J. Basic Appl. Zool. 66 (2013) 27-33. doi: [10.1016/j.jobaz.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2012.12.006)
- [50] S.N El-Beshbishi, S. El Bardicy, M. Tadros, M. Ayoub, A. Taman, Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina*. Acta Trop. 141 (2015) 37-45. doi: [10.1016/j.actatropica.2014.09.018](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.09.018)
- [51] J.R. Coelho, F.S.M. Bezerra, The effects of temperature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (2006) 223-224. doi: [10.1590/s0074-02762006000200016](https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000200016)
- [52] L.G. Magalhães, J.M. Souza, K.A.L. Wakabayashi, R.S. Laurentiz, A.H.C. Vinhólis, K.C.S. Rezende, G.V. Simaro, J.K. Bastos, V. Rodrigues, V.R. Esperandim, D.S. Ferreira, A.E.M. Crotti, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. Parasitol. Res. 110 (2012) 1747-1754. doi: [10.1007/s00436-011-2695-7](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2695-7)
- [53] R.M.P.B. Costa, A.F.M. Vaz, H.S. Xavier, M.T.S. Correia, M.G. Carneiro-da-Cunha, Phytochemical screening of *Phthirusa pyrifolia* leaf extracts: Free-radical scavenging activities and environmental toxicity. S. Afr. J. Bot. 99 (2015) 132-137. doi: [10.1016/j.sajb.2015.03.193](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.193)
- [54] M. Favilla, L. Macchia, A. Gallo, C. Altomare, Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. Food Chem Toxicol. 44 (2006) 1922-1931. doi: [10.1016/j.fct.2006.06.024](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.024)
- [55] C. Pretti, M. Oliva, R. Di Pietro, G. Monni, G. Cevasco, F. Chiellini, C. Pomelli, C. Chiappe, Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 101 (2014) 138-145. doi: [10.1016/j.ecoenv.2013.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.008)

[56] C.O. Esimone, M.U. Adikwu, Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. *Fitoterapia*. 70 (1999) 428-431. doi: [10.1016/s0367-326x\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00054-4)

FIGURES

Figure 1 - Spectrum of HPLC of divaricatic acid obtained from *Ramalina aspera*.

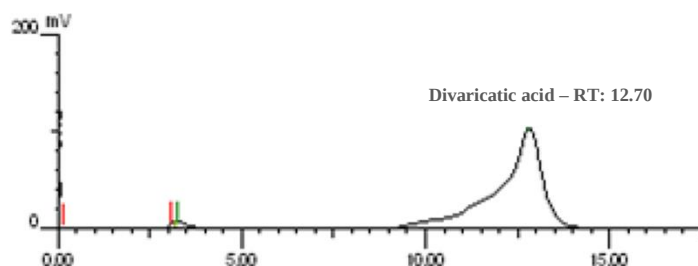


Figure 2 - Chemical structure of divaricatic acid.

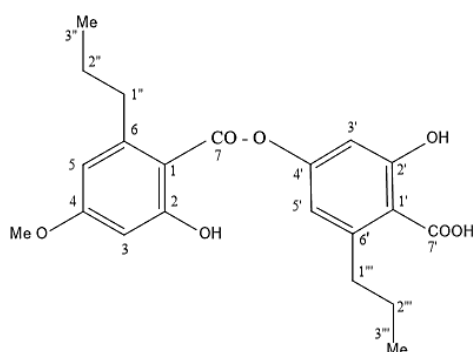
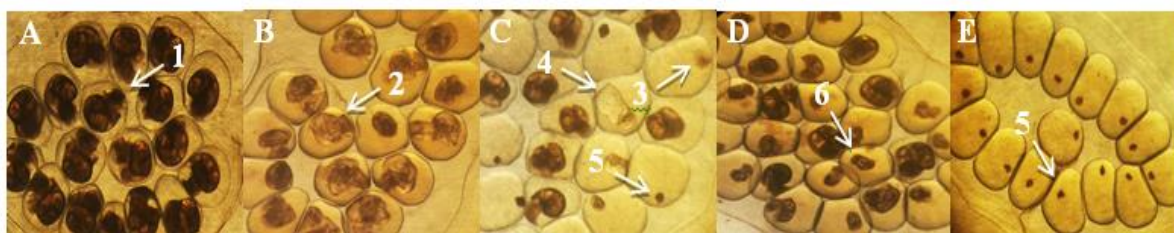
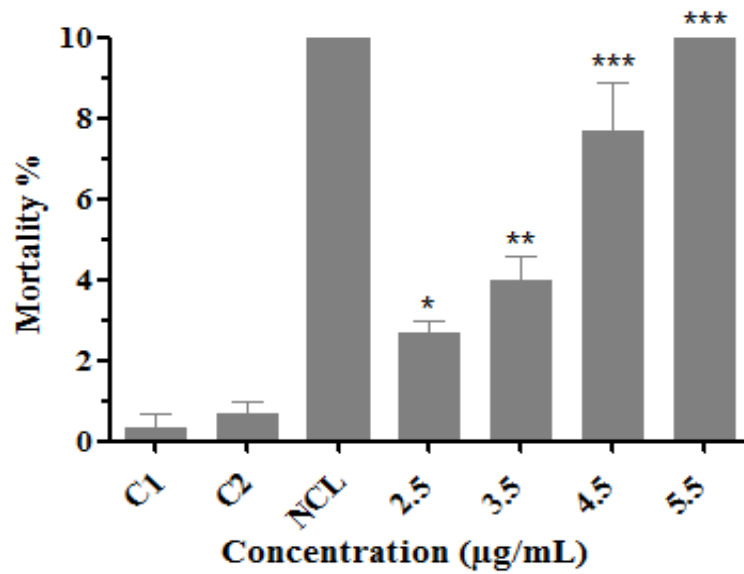


Figure 3 - (40X magnification) - Abnormalities resulting from exposure of *Biomphalaria glabrata* embryos to divaricatic acid.



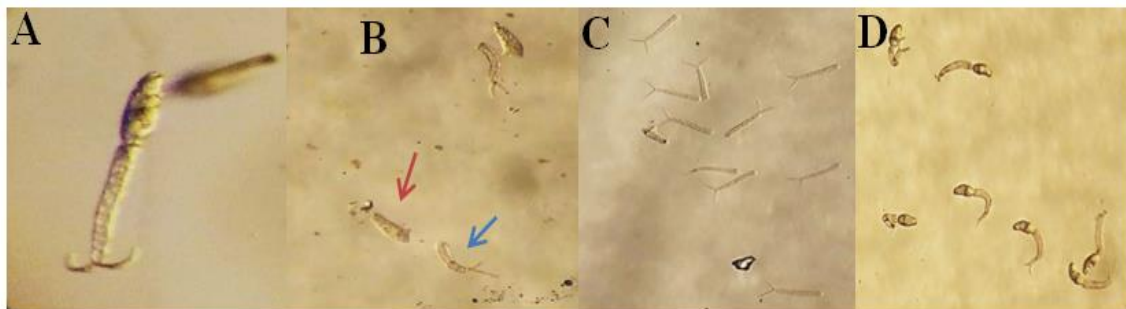
A-1 - Normal Embryo (Control 1 - filtered and dechlorinated water). B-2 - shell malformation (11.5 $\mu\text{g/mL}$ / 18h). C-3 – nonspecific anomaly; 4 – hydropic embryo; 5 - dead embryo (9.5 $\mu\text{g/mL}$ / 24h). D-6 - embryonic development delay (12 $\mu\text{g/mL}$ / 6h). E-5 - dead embryo (Niclosamide - 1 $\mu\text{g/mL}$ / 6h).

Figure 4 - Mortality of *Biomphalaria glabrata* adult snails exposed to divaricatic acid.



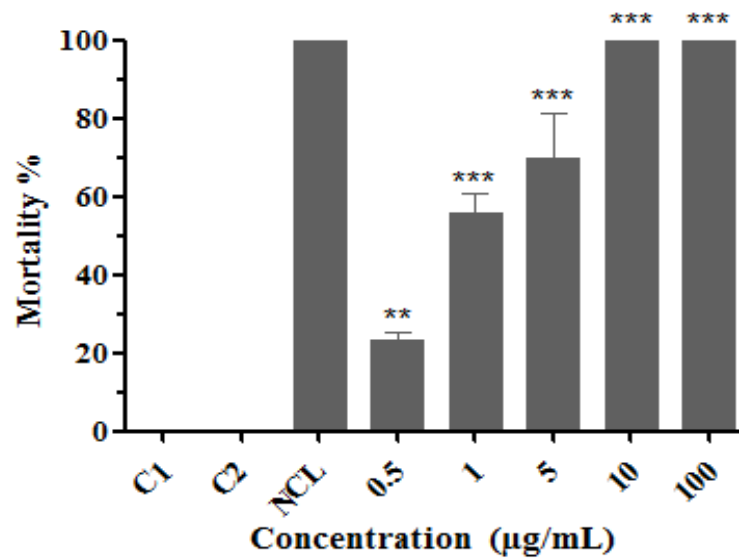
Control 1 (C1): filtered and dechlorinated water. Control 2 (C2): 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide at a concentration of 1 µg/mL. Significant results were compared with control 2. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Figure 5 – (40X Magnification) *Schistosoma mansoni* cercariae exposed to divaricatic acid.



Schistosoma mansoni cercariae - In A, exposed to 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water showing the preservation of the body and tail. In B, exposed for 15 min at 100 µg/mL of divaricatic acid, showing the separation of body (red arrow) and tail (blue arrow). In C, exposed for 30 min at 10 µg/mL divaricatic acid. In D, dead cercariae exposed to 1µg/mL of Niclosamide, presenting a contorted appearance.

Figure 6 – Mortality of *Schistosoma mansoni* cercariae exposed to divaricatic acid for 120 minutes.



Control 1 (C1): filtered and dechlorinated water. Control 2 (C2): 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide at a concentration of 1 µg/mL. Significant results were compared with control 2. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$

TABLES

Table 1 - Unviability of *Biomphalaria glabrata* embryos subjected to divaricatic acid at different exposure times (6, 12, 18 and 24 hours).

Unviability by Exposure Period				
Experimental groups (µg/mL)	6 hours ± SD	12 hours ± SD	18 hours ± SD	24 hours ± SD
Control 1	1.33 ± 1.15	1	0.6 ± 0.57	1
Control 2	3.33 ± 1.52	2.33 ± 0.57	3 ± 2.64	2 ± 1.7
Niclosamide	100	100	100	100
Dicaricatic acid				
7.5	0.6 ± 0.57	6.33 ± 1.52	6.33 ± 4.04	10.66 ± 7.3
8.0	1	9.66 ± 4.61	19.66 ± 3.51	31.33 ^a ± 19.0
8.5	1.66 ± 0.57	11 ± 1.0	32.66 ^c ± 5.77	33.66 ^a ± 28.5
9.5	1.66 ± 2.08	18 ^a ± 6.92	35 ^c ± 8.88	39.33 ^b ± 8.0
10	8.33 ± 3.05	25.66 ^b ± 8.38	39.66 ^c ± 4.50	47.33 ^c ± 16.2
10.5	10.33 ± 6.02	36.66 ^c ± 11.68	49 ^c ± 11.53	60.66 ^c ± 9.0
11	15 ^a ± 4.35	44.66 ^c ± 9.01	55.33 ^c ± 9.07	67.66 ^c ± 17.1
11.5	19.33 ^b ± 3.78	45.66 ^c ± 4.93	67.33 ^c ± 12.01	72.66 ^c ± 6.8
12	25.66 ^c ± 4.04	66.66 ^c ± 12.42	75 ^c ± 17.44	84 ^c ± 15.3
15	81.66 ^c ± 14.29	94 ^c ± 5.19	96 ^c ± 6.24	100 ^c
20	100 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c

Control 1: filtered and dechlorinated water. Control 2: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. Niclosamide at a concentration of 1 µg/mL. Significant results were compared with control 2. The significance levels are expressed by a (p <0.05), b (p <0.01) and c (p <0.001)

Table 2 - Lethal concentration (LC) for adult snails and *Biomphalaria glabrata* embryos exposed to divaricatic acid.

Exposure Time		Concentration (µg/mL)		
		LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Embryos				
06 hours		10.29	13.34	16.39
12 hours		8.23	11.60	14.96
18 hours		6.95	10.54	14.12
24 hours		6.02	10.29	13.29
Adult Snails				
24 hours		1.68	3.58	5.49

Table 3 – Cercariae mortality after exposure to divaricatic acid in relation to exposure time.

Experimental groups (µg/mL)	Exposure time (minutes)			
	15	30	60	120
Control 1	-	-	-	-
Control 2	-	-	-	-
Niclosamide	+++	+++	+++	+++
Divaricatic acid				
0.5	-	-	+	+
1.0	-	-	+	++
5	-	+	+	++
10	+	+++	+++	+++
100	+++	+++	+++	+++

Control 1: filtered and dechlorinated water. Control 2: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. Niclosamide at a concentration of 1 µg/mL. Total elimination of cercariae (+++), elimination higher than 50% of cercariae (++), less than 50% elimination of cercariae (+) and absence of lethality (-).

Table 4 - Lethality of divaricatic acid on *Artemia salina*.

Experimental groups (µg/mL)	(%)
Control 1	0
Control 2	2.5
25	0
50	5
100	7.5
200	15
400	30 ^a

Control 1 (C1): filtered seawater. Control 2 (C2): 0.5% DMSO in seawater. Significant results were compared with control 2. a = p <0.001.

5 CONCLUSÕES

- Através da metodologia utilizada, o ácido divaricático foi purificado de forma eficaz (97% de pureza);
- O ácido divaricático demonstrou elevada toxicidade sobre caramujos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata*, apresentando 100% de letalidade na concentração de 5,5 µg/mL;
- O potencial embriotóxico do ácido divaricático foi comprovado. Além da letalidade sobre os embriões, causou malformações de concha, embriões hidrópicos, retardo do desenvolvimento embrionário e malformações inespecíficas;
- A atividade cercaricida do ácido divaricático foi observada na concentração de 10 µg/mL em 30 minutos de exposição. Nas concentrações subletais, as cercárias apresentaram alterações de motilidade de características variadas, sugerindo um menor potencial de penetração;
- Através do bioensaio com *Artemia salina*, a seletividade do ácido divaricático foi confirmada, sendo seu uso ambientalmente seguro até a concentração de 200 µg/mL;
- Todos os resultados foram compatíveis com as exigências estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde para o uso seguro de substâncias moluscicidas de origem natural.

6 ANEXOS

ANEXO 1

Normas de submissão da BBA – General Subjects

Guide for Authors

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-4165

DESCRIPTION

BBA General Subjects accepts for [submission](#) either original, hypothesis-driven studies or reviews covering subjects in **biochemistry** and **biophysics** that are considered to have general interest for a wide audience. Manuscripts with interdisciplinary approaches are especially encouraged.

Preferred topics include medically important biochemistry/biophysics research and emerging areas such as **nanobiology** (nanoparticles, nanotoxicology, nanomedicine), **systems biology** (genomics, proteomics, lipidomics, glycomics, bioinformatics based on experimental approaches), **chemical biology** (chemical compounds, drug mechanisms, synthesis of novel compounds, click chemistry), **structural biology** (crystallography, NMR, multimeric proteins, protein dynamics), **novel complexes** (pure natural compounds, synthetic compounds, protein complexes, nucleic acid derivatives), **cellular signaling** (receptor signaling, protein phosphorylation cascades, phosphatases, secondary messengers, transcription regulation, gene expression), **glycobiology** (sugar metabolites and metabolism, glycosylated proteins, membrane protein, glycosylation, glycomics), **redox biology** (redox switches, glutathione and thioredoxin systems, oxygen and nitrogen radical species, superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, nitric oxide, peroxides, hypoxia, redox regulation of transcription factors), **neurobiology** (neuronal growth factors and nerve signaling, glial cells, autonomic and central nervous systems), **stem cells** (differentiation, stem cell isolation and cultivation, growth factors), **imaging methodologies** and **mechanistic characterization** of compounds having biochemical importance and general interest (drug leads, toxicants, nutrients, metabolites).

Authors must provide a sentence at [submission](#) stating the reason that the work described in the manuscript has general significance and interest to a wide audience. Claims of novelty do not suffice. The author statement will be used as an aid in the reviewing process and will be included in the final version of the accepted paper to orient readers of *BBA General Subjects*.

AUDIENCE

Biochemists, molecular biologists, glycobiologists, developmental biologists

IMPACT FACTOR

2014: 4.381 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Chemical Abstracts
Current Contents/Life Sciences
Index Chemicus
MEDLINE®
EMBASE
Science Citation Index
Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases
Scopus
EMbiology

EDITORIAL BOARD

Executive Editors:

Elias Arnér, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
Thioredoxin Reductase, Selenocysteine, Selenoproteins, Cancer, Biochemistry
David Litchfield, Western University, London, Ontario, Canada

Scientific Editors (Elsevier, Cambridge, MA, USA):

Shawanna Buttery
Claudia Montefusco
Denise Wells

Section Editors:

Fadi Bou-Abdallah, State University of New York (SUNY), Potsdam
Bioinorganic and Physical Chemistry of Biological Processes, Metallo-Biochemistry, Iron Proteins and Complexes, Radicals in Proteins, Biomineralization, Ligand-Protein and Protein-Protein Interactions
Henrik Clausen, University of Copenhagen, Copenhagen N, Denmark
Michael Cusick, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA
Protein interactions, Systems biology, Biological networks, Proteomics
Nancy Dahms, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA
Lectins, Insulin-Like Growth Factor II Signaling, Cell Surface Receptors, Molecular Sequence Data, Tertiary Protein Structure, Lysosomes
Hans-Joachim Gabius, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), München, Germany
Glycoconjugates, Glycome, Glycosciences, Lectins, Sugar Code.
Andy Ghio, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Chapel Hill, North Carolina, USA
Lung diseases, Iron homeostasis, Oxidative stress
Sara Goldstein, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel
Pulse radiolysis, kinetics, nitroxides, peroxynitrite, NO-donors
Mark Hamann, University of Mississippi, University, Mississippi, USA
Natural Products, NMR Structure, Cancer and Infectious Diseases, Synthesis, Biosynthesis
Dorothy Hausman, University of Georgia, Athens, GA, Georgia, USA
Biochemical Assessment of Nutritional status, Older Adults, Vitamin D, Obesity, Adipose Tissue Development
Rong-Qiao He, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China
tau Proteins, Xenopus, Kinetics, Atomic Force Microscopy, Protein Denaturation and Folding
Johannes Herrmann, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany
mitochondrial biogenesis, protein targeting, redox biology, membrane biology, mitochondrial ribosomes, yeast genetics
Stefan Hohmann, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden
Saccharomyces cerevisiae, Proteins, Gene Expression Regulation, Osmotic Pressure, Molecular Sequence Data
Elaine Holmes, Imperial College London, Kensington, London, UK
Magnetic Resonance Spectroscopy, Metabolism, Principal Component Analysis, Biological Markers, Toxicology, Automated Pattern Recognition
Hideori Ichijo, University of Tokyo, Tokyo, Japan
MAP Kinase, Stress Signaling, ER Stress, Apoptosis, Neurodegeneration, Cancer
Anders H. Johnsen, Rigshospitalet, København, Denmark
Neuropeptides, Post-Translational Protein Processing, Molecular Sequence Data, High Pressure Liquid Chromatography, Mass Spectrometry, Radioimmunoassay, protein chemistry

Gordan Lauc, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Glycobiology; Glycomics; Protein glycosylation; High-throughput research; Complex genetics of glycosylation; Glycosylation and disease.

Hong Kyu Lee, Seoul, South Korea

Mitochondrial DNA, Mitochondrial Dysfunction, Environmental Toxins, Metabolic Syndrome, Metabolic Scaling.

Christopher Horst Lillig, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

Glutaredoxins, Oxidation-Reduction, Molecular Sequence Data, Mitochondria, Oxidative Stress, Thioredoxins

Mary Lipton, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, USA

Proteomics, Bacterial Proteins, Biophysical Methods for Peptide Mapping, Molecular Sequence Data

Bengt Mannervik, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden

Glutathione S-Transferases, Kinetics and Catalysis, Isoenzymes, Site-Directed Mutagenesis

Henry Miziorko, University of Missouri at Kansas City, Kansas City, , Missouri, USA

Structure/function correlations accounting for enzyme catalysis and regulation, Isoprenoid/sterol biosynthesis, Ketogenesis, Photosynthetic CO₂ assimilation, Molecular basis of inherited disease

Lennart Nilsson, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden

molecular dynamics simulation, protein-nucleic acid complexes, structural modelling, molecular biophysics, conformational dynamics.

Denis Pompon, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif sur Yvette, France

Cytochrome P450 Enzyme Systems, Molecular Cloning, Genetic Engineering, Oxidation-Reduction, Kinetics, Synthetic Biology, Bio-inspired Nanosystems, Directed Evolution of proteins

Tadashi Suzuki, RIKEN, Saitama, Japan

Glycan catabolism, ER-associated degradation, N-linked glycan, Enzyme

Masashi Tanaka, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan

Jerry Turnbull, University of Liverpool, Liverpool, UK

Heparan Sulfate and Heparin, Signal Transduction, Carbohydrate Sequence, Structure-Activity Relationships

Mathias Uhlen, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

Proteomics, Antibodies, Immunohistochemistry, Molecular Sequence Data, Gene Expression Profiling, Protein Array Analysis

Rebecca Wade, Heidelberg Institute for Theoretical Studies (HITS), Heidelberg, Germany

Molecular modelling and simulation, structure-based drug design, bioinformatics, molecular systems biology, biomolecular recognition, protein-ligand interactions.

Yau-Huei Wei, National Yang Ming University, Taipei, Taiwan, ROC

Mitoc1. Mitochondrial disorders, Bioenergetics, Oxidative stress, Metabolic regulation, Degenerative diseases

Christopher West, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma, USA

Glycobiology, Ubiquitin Ligase, Cell Wall, Hypoxia, O₂-Sensing, Prolyl Hydroxylation.

Hans Westerhoff, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands

Biological Models, Kinetics, Systems Biology, Thermodynamics, Computer Simulation

Yoshihiro Yoneda, Osaka University, Osaka, Japan

Nuclear Transport, Nucleus, Nuclear Pore Complex, Cell Differentiation, Intracellular Molecular Traffic.

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

BBA General Subjects accepts for submission either original, hypothesis-driven studies or reviews covering subjects in **biochemistry** and **biophysics** that are considered to have general interest for a wide audience. Manuscripts with **interdisciplinary** approaches are especially encouraged. Preferred topics include **medically important** biochemistry/biophysics research and **emerging areas** such as **nanobiology** (nanoparticles, nanotoxicology, nanomedicine), **systems biology** (genomics, proteomics, lipidomics, glycomics, bioinformatics based on experimental approaches), **chemical biology** (chemical compounds, drug mechanisms, synthesis of novel compounds, click chemistry), **structural biology** (crystallography, NMR, multimeric proteins, protein dynamics), **novel complexes** (pure natural compounds, synthetic compounds, protein complexes, nucleic acid derivatives), **cellular signaling** (receptor signaling, protein phosphorylation cascades, phosphatases, secondary messengers, transcription regulation, gene expression), **glycobiology** (sugar metabolites and metabolism, glycosylated proteins, membrane protein, glycosylation, glycomics), **redox biology** (redox switches, glutathione and thioredoxin systems, oxygen and nitrogen radical species, superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, nitric oxide, peroxides, hypoxia, redox regulation of transcription factors), **neurobiology** (neuronal growth factors and nerve signaling, glial cells, autonomic and central nervous systems), **stem cells** (differentiation, stem cell isolation and cultivation, growth factors), **imaging methodologies** and **mechanistic characterization** of compounds having biochemical importance and general interest (drug leads, toxicants, nutrients, metabolites).

Authors must provide a sentence at submission stating the reason that the work described in the manuscript has **general significance and interest to a wide audience**. Claims of novelty do not suffice. The author statement will be used as an aid in the reviewing process and will be included in the final version of the accepted paper to orient readers of *BBA General Subjects*.

Structural data

For papers describing structures of biological macromolecules, the atomic coordinates and the related experimental data (structure factor amplitudes/intensities and/or NMR restraints) must be deposited at a member site of the Worldwide Protein Data Bank (<http://www.wwpdb.org>): RCSB PDB (<http://www.pdb.org>), MSD-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>), PDBj (<http://www.pdbj.org>), or BMRB (<http://www.bmrb.wisc.edu>). Manuscripts must carry a statement that coordinates and structure factors (or NMR restraints) have been deposited in the Protein Data Bank. The accession number(s) must be cited in the manuscript at the end of the Materials and Methods section. Authors must agree to release the atomic coordinates and experimental data immediately upon publication.

It is increasingly common for coordinates to be deposited in the Protein Data Bank without an associated publication. Before submission to BBA, authors are expected to search the Protein Data Bank for related structures using one or more alignment programs and report the outcome. Prior deposition of related coordinates, without an associated publication, does not necessarily preclude publication in BBA. The primary criteria for publication of a structure in BBA are that it provides novel structural insights or important new functional and biological insights that are likely to be of general interest.

Types of paper

Full-length research articles, Reviews and mini-reviews

Contact details for submission

Papers should be submitted using the BBA General Subjects online submission system, <http://ees.elsevier.com/bbagen>. For questions on the submission and reviewing process, please contact the Editorial Office at bbagen@elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

BBA General Subjects follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: (1) All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. (2) All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. (3) All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. (4) Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. (5) Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). (6) Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work. As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document link directly in the article. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org/>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here: http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the pop-up menu).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or 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 submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

During the submission process, you will be required to provide the names, addresses, and e-mail addresses of 4 potential referees, as well as a brief description of their expertise relevant to your manuscript. Suggested reviewers should be individuals qualified to evaluate the work you have submitted. The reviewers suggested may not be current, recent or extensive collaborators of yours, and cannot have been involved in the preparation of the manuscript. Please note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

*Authors may request exclusion of certain referees if conflicts of interest are anticipated. However, no more than 3 such names should be given. Entire groups or institutions **cannot** be specified for exclusion.*

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper includes page numbers - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. For more information on the types of peer review, please visit:

<https://www.elsevier.com/reviewers/peer-review>.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Page 2 of the typescript should be reserved for the Abstract which should have no more than 250 words. For Regular Articles, this should follow a structured format, sub-divided into subsections entitled "Background"; "Methods"; "Results"; "Conclusions" and "General Significance". Each subsection should be brief and informative, emphasizing those points that are unique to the paper. Review Articles should also contain a Structured Abstract, sub-divided into subsections entitled "Background"; "Scope of Review"; "Major Conclusions"; and "General Significance". Since summaries are increasingly used by abstracting services which will cut off after a fixed number of words, it is important not to exceed the maximum number of words and to avoid bibliographic references and non-standard abbreviations.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Standards for Reporting Enzymology Data (STRENDa)

This journal follows the recommendations of the STRENDa (**S**tandards for **R**eporting **E**nzymology **D**ata) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this [pdf](#) file.

All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay **must** always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters.

First-order and second-order rate constants: see [pdf](#) for full instructions.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

While it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast,

or color balance are acceptable as long as they are applied to the entire image and do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Digital images in manuscripts nearing acceptance for publication may be scrutinized for any indication of improper manipulation. *BBA General Subjects* reserves the right to ask for original data or images and, if these are not satisfactory, we may decide not to accept the manuscript.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bba-general-subjects>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-itwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

3D molecular models

You can enrich your online articles by providing 3D molecular models (optional) in PDB, PSE or MOL/MOL2 format, which will be visualized using the interactive viewer embedded within the article. Using the viewer, it will be possible to zoom into the model, rotate and pan the model, and change display settings. Submitted models will also be available for downloading from your online

article on ScienceDirect. Each molecular model will have to be uploaded to the online submission system separately, via the '3D molecular models' submission category. For more information see: <https://www.elsevier.com/3DMolecularModels>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

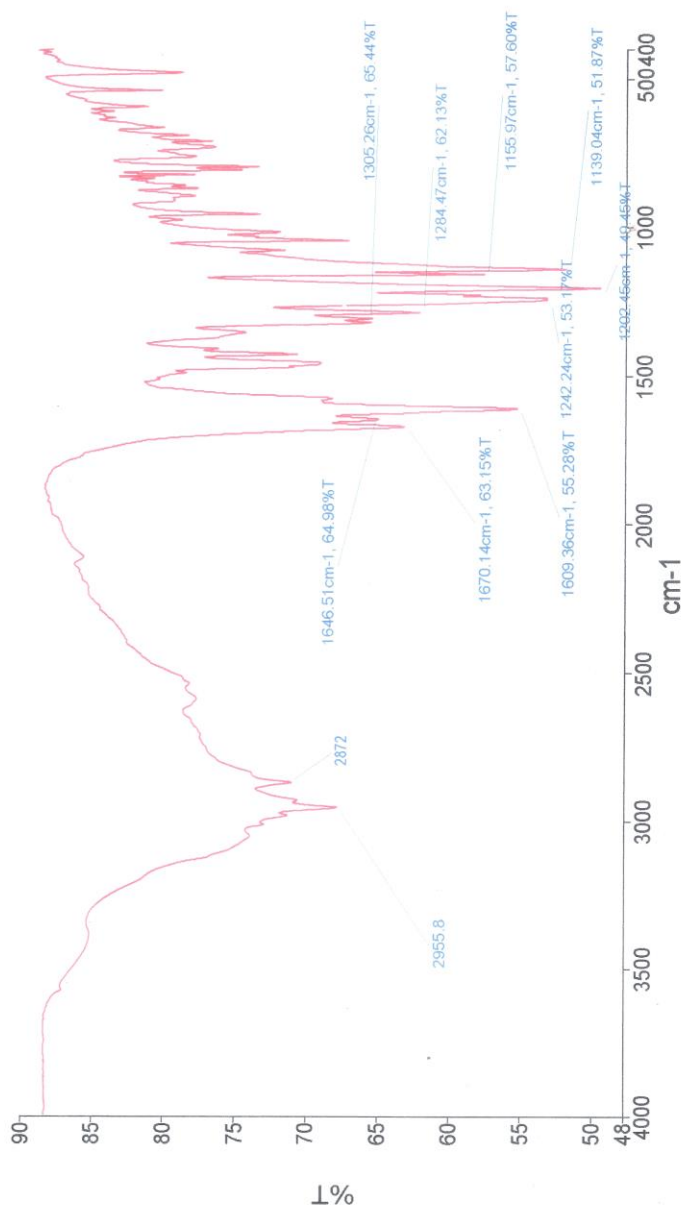
Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

ANEXO 2

Análises químicas: Infravermelho

Analyst
Date
Administrator
Wednesday, September 23, 2015 2:42 PM



N0625-4_1 Acido Divaricico/Hianna/Nicacio/Bioquimica Wednesday, September 23 2015

ANEXO 3

Análises químicas: Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

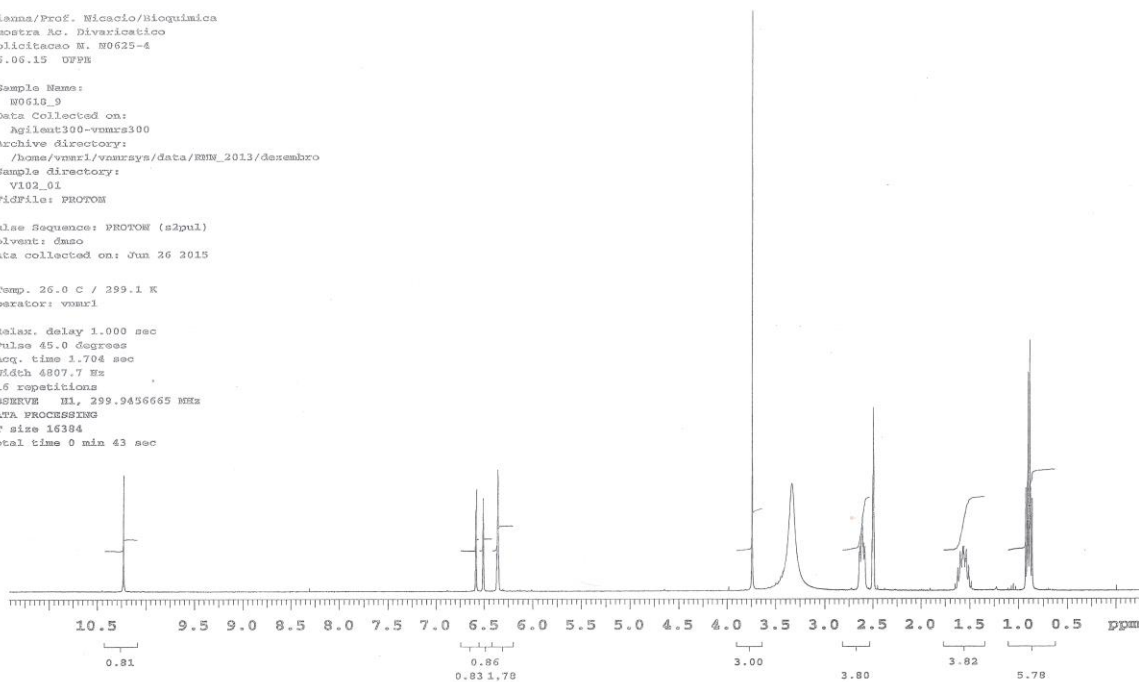
Hianna/Prof. Nicacio/Bioquímica
Amostra Ac. Divaricático
Solicitação N. 00625-4
26.06.15 UFPA

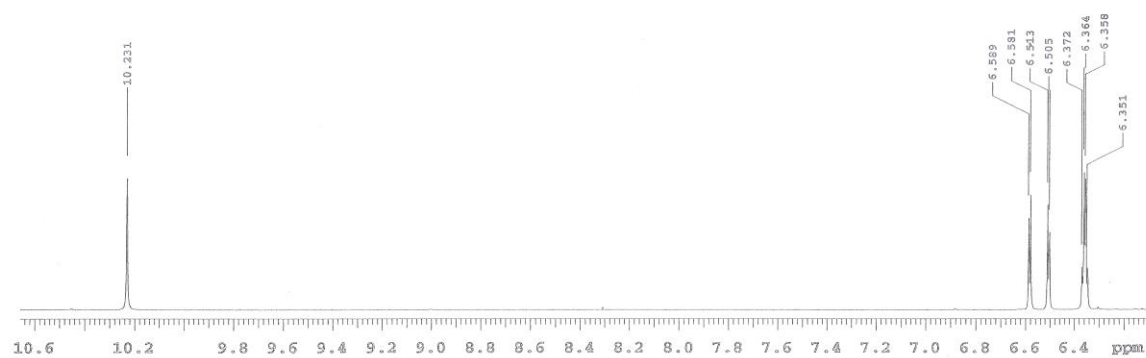
Sample Name:
N0610_9
Data Collected on:
Agilent300-vnmr300
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmr300/data/2015/20150626
Sample directory:
V102_01
F102File: PROTON

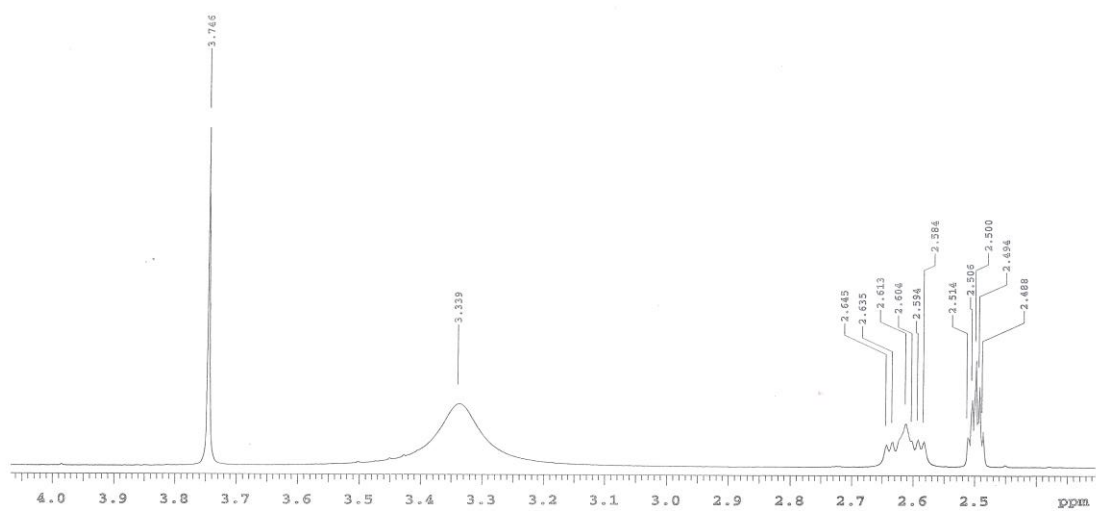
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jun 26 2015

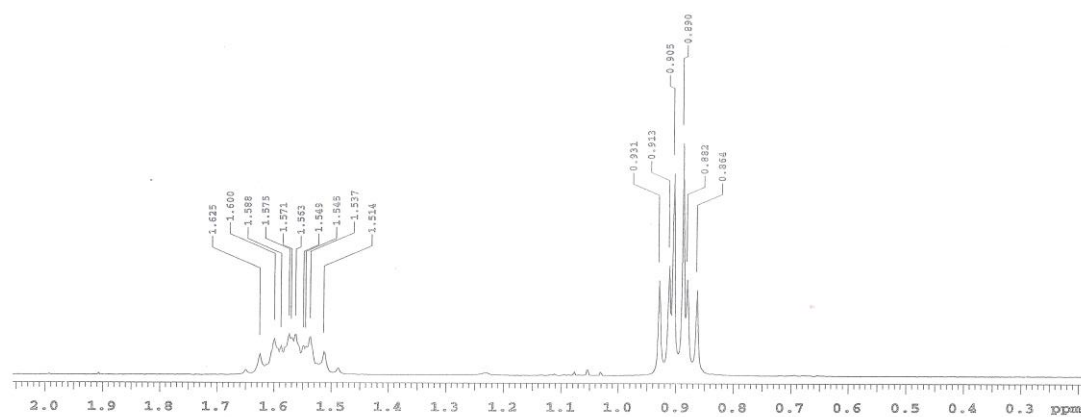
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 4807.7 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 299.9456665 MHz
DATA PROCESSING
FT size 16384
Total time 0 min 43 sec









ANEXO 4

Resumos enviados a eventos científicos

**EVALUATION OF EMBRYOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF
DIVARICATIC ACID EXTRACTED FROM *Ramalina* sp. ON SNAILS *Biomphalaria*
glabrata (SAY, 1818) AND *Artemia salina***

Hianna Arely Milca Fagundes Silva ¹, José Luís Ferreira Sá ¹, Williams Nascimento de Siqueira ², Hallysson Douglas Andrade de Araújo ¹, Alessandra Nascimento de Carvalho ¹, Mônica Cristina Barroso Martins ¹, Luanna Ribeiro Santos Silva ², Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque ³, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo ², Nicácio Henrique da Silva ¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

INTRODUCTION: Schistosomiasis, parasitic disease caused by *Schistosoma mansoni*, is considered a serious public health problem, being endemic in 47% of municipalities in Pernambuco. One of the alternatives to combat the disease is the elimination of schistosomiasis vector, the snail *Biomphalaria glabrata*. Lichens and their secondary metabolites are described in the literature as having various biological activities such as anti-inflammatory, anti-asthmatic, antibacterial and antifungal activities. **OBJECTIVE:** To evaluate the toxicity of divaricatic acid on embryos of *B. glabrata* and cytotoxic activity by *A. salina* bioassay. **MATERIAL AND METHODS:** For the assay with *A. salina*, the divaricatic acid was diluted in seawater at concentrations of 25, 100, 200 and 400 µg / mL and the solution placed in test tubes with 10 artemias each. After 24 hours of exposure, was found the number of live and dead individuals. The test was performed in quadruplicate. For the assay with *B. glabrata* embryos, approximately 100 embryos were divided into petri dishes and subjected to divaricatic acid diluted in distilled water at concentrations of 2.5, 5, 10 and 25 µg / ml for 24 hours and observed until hatching of egg masses and classified as normal (viable), malformed and dead (non-viable). The test was performed in triplicate. The statistical test used was ANOVA with $p < 0.05$. **RESULTS AND DISCUSSION:** To test the *A. salina*, the divaricatic acid was 0%, 7.5%, 15% and 30% mortality at concentrations of 25, 100, 200 and 400 µg / mL, respectively. For embryotoxicity testing, the results were 4%, 6.6%, 43.33% and 100% for concentrations of 2.5, 5, 10 and 25 µg / ml, respectively. **CONCLUSION:** It can be concluded that the divaricatic acid showed effectiveness in the elimination of embryos of *B. glabrata*, as well as low cytotoxicity assay using the *A. salina*.

Keywords: molluscicides, natural products, lichens.

Acknowledgment: CNPq

POSSÍVEL AGENTE MOLUSCICIDA DA ESPÉCIE *Biomphalaria glabrata*: ATIVIDADE DO ÁCIDO DIVARICÁTICO.

Hianna Arely Milca Fagundes Silva¹; José Luís Ferreira Sá¹; Williams Nascimento de Siqueira²; Hallysson Douglas Andrade de Araújo¹, Maíra de Vasconcelos Lima³, Luanna Ribeiro Santos Silva², Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque⁴, Mônica Cristina Barroso Martins¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo³, Nicácio Henrique da Silva¹.

1 Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2 Departamento de Energia Nuclear – Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 3 Departamento de Biofísica e Radiobiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 4 Departamento de Medicina Tropical – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* são conhecidos por serem hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica. Doença endêmica em vários países da América do Sul, inclusive no Brasil, sendo considerada um grave problema de saúde pública. Uma das alternativas para combater a doença é o controle populacional dos moluscos vetores desta patologia. Nesse sentido, a niclosamida vem sendo utilizada como moluscicida. Entretanto, por ser um produto sintético, possui custo elevado e apresenta alta toxicidade ao meio ambiente. A busca de um substituto eficiente, de baixos custo e toxicidade tem sido investigada entre diversos produtos naturais. O ácido divaricático, metabólito secundário originário do líquen *Ramalina sp.* tem apresentado um potencial biotecnológico adequado a aplicações moluscicidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade moluscicida do ácido divaricático sobre *B. glabrata* e seus embriões. Para o bioensaio com caramujos adultos, 10 exemplares com diâmetro de 10-14mm foram acondicionados em recipientes com capacidade de 60 mL e expostos ao ácido divaricático nas concentrações de 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5 µg/ml durante 24 horas e observados por 8 dias. Para a embriotoxicidade, 100 embriões de *B. glabrata* no estágio de blástula, foram colocados em placas de petri e expostos ao ácido divaricático nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/ml, durante 12 e 24 horas e observados por 8 dias consecutivos. Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA e o Student-Newman Keuls com $p < 0,05$. Os caramujos adultos expostos ao ácido divaricático apresentaram 26.66%, 40%, 76.66% e 100% de mortalidade para as concentrações de 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5 µg/ml, respectivamente. Para o teste de embriotoxicidade com 12h a inviabilidade dos embriões foi de 0%, 25.66%, 94% e 100% e após 24h foi 6.66%, 47.33%, 100% e 100% para as concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/ml, respectivamente. O ácido divaricático apresentou eficiência na eliminação de embriões em fase de blástula, bem como de caramujos adultos de *B. glabrata* em baixas concentrações conforme o preconizado pela OMS.

Apoio: CNPq e PROPESQ-UFPE.