

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

HALLYSSON DOUGLAS ANDRADE DE ARAUJO

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÁCIDO ÚSNICO E DO USNATO DE POTÁSSIO
SOBRE A *Biomphalaria glabrata***

RECIFE
2016

HALLYSSON DOUGLAS ANDRADE DE ARAUJO

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÁCIDO ÚSNICO E DO USNATO DE POTÁSSIO
SOBRE A *Biomphalaria glabrata***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima

Co-Orientadora: Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins

RECIFE
2016

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

Araújo, Hallysson Douglas Andrade de
Atividade moluscicida do ácido úsnico e do usnato de potássio sobre a
Biomphalaria glabrata / Hallysson Douglas Andrade de Araújo. – Recife: O Autor, 2016.
113 f. : il.

Orientadores: Vera Lúcia de Menezes Lima, Mônica Cristina Barroso
Martins
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.
Lima, Vera Lúcia de Menezes (orient.) II. Martins, Mônica Cristina Barroso
(coorient.) III. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-226

HALLYSSON DOUGLAS ANDRADE DE ARAUJO

ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÁCIDO ÚSNICO E DO USNATO DE POTÁSSIO
SOBRE A *Biomphalaria glabrata*

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

Aprovado em 16/02/2016

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima - Presidente

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Prof. Dr. André de Lima Aires

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar ofereço todo o meu tributo, fonte de toda sabedoria, que me concedeu a vida, abençoa-me com a inteligência e proporciona todos os dias muitas vitórias como amor, saúde, força, coragem, proteção e confiança para executamos os nossos planos conquistando assim grandes sonhos, os quais muitos são projetos seus. Que está presente nas alegrias e me encoraja nos momentos difíceis. Acima de tudo quero lhe agradecer, porque não é o fim de nada, mas o começo de um longo caminho. Muito obrigado meu Deus.

A minha Digníssima esposa Silvânia Araújo e Filha Lavínya Araújo também agradeço e dedico este trabalho, nesta trajetória foram apoios incondicionais, companheirismo, confiança, conselhos, paciência e muitas orações. A minha princesinha pelos momentos alegres e de realização ! Muito Obrigado S2. A vida acadêmica é gratificante, porém me ausenta de bons momentos com vocês.

Ao meus pais Raimundo Gomes e Maria José responsáveis pela minha existência e formação dos meus princípios e caráter. Amor eterno.

A minha família (irmã, tios(as), primos(as) cunhados (a)...) e amigos pelas orações, preocupações e apoio sendo fundamental e de grande valor na minha existência, Obrigado por vocês existirem !

Aos meus grandes amigos, Juliana Serafim, Vasti Feitosa, Jurandir Silva, Fagner Andrade, Félix e Thyago Firmino, Janilson Félix, Karine Schmidt, Carlos Antônio, Renato Alves (Pedrinho) e Luciano Francisco pelas orações, amizade, cuidado, empenho e muitos conselhos.

A minha orientadora Professora Dr^a, Vera Lúcia de Menezes Lima pela confiança depositada, aprendizado, orientações, amizade, paciência, competência e apoio.

A minha co-orientadora Mônica Cristina Barroso Martins pela competência e orientações (na bancada e escrita) deste trabalho.

Ao Professor Dr. Nicácio Henrique da Silva pela colaboração do laboratório de produtos naturais. Os seus ensinamentos contribuíram muito com para o meu aprendizado, principalmente na metodologia de purificação e síntese. Muito Obrigado.

A Dr^a Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo pela colaboração, caris: disponibilidade e muitos conselhos na parte prática e escrita desta pesquisa.

Ao técnico do laboratório de Produtos Naturais da UFPE o senhor João Virgílio pelas orientações e ensinamento no processo de purificação do ácido úsnico.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica e Radiobiologia, Hianna Fagundes, José Luis, Williams Siqueira, Luanna Ribeiro, Máira Vasconcelos, Ricardo Calazans, Vinícius Moraes, Katarina Santos e Maria Luiza.

Aos amigos da Pós-graduação, em especial a turma egressa do mestrado 2014.1 e da disciplina de Fronteiras Moleculares e Fisiológicas da Estrutura e Função Celular I, vocês tornaram as aulas mais agradáveis e nos momentos em que precisamos pudemos contar uns com os outros, principalmente nos seminários em equipe.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais a Alexsandra Carvalho e Amanda Uchôa.

Aos Amigos do Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas Hassan Albuquerque, Caíque Silveira, Weber Nasimento, José Guedes, Ana Paula, Janaina Karen, Thaíse, Tatiane e Rebeca.

A todo o corpo docente da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Secretario da Pós-Graduação, o senhor Djalma pela paciência, carisma e profissionalismo, a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia representada pela Dra. Patrícia Paiva pelo apoio durante o curso.

A todas as pessoas que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro durante o período do curso de Pós-Graduação.

“Nunca troque sua ética profissional por uma colaboração experimental”
Autor

“Posso todas as coisas em **Cristo** que me fortalece”
Filipenses. cap. 4 vers. 13

RESUMO

No Brasil, Pernambuco é um dos estados com maior prevalência em esquistossomose mansônica, doença cujo principal vetor é a *Biomphalaria glabrata*. Niclosamida é o principal produto usado de controle da *B. glabrata*, mas devido a sua toxicidade o seu uso compromete o ecossistema aquático, tornando importante a busca por moluscicidas alternativos e de menor toxicidade ambiental, como por exemplo o ácido úsnico (AU) purificado de *Cladonia substellata* e o seu derivado o usnato de potássio (USNP). Este trabalho objetivou avaliar a atividade moluscicida do UA e do USNP, sobre estádios embrionários de *B. glabrata* e moluscos adulto. O AU foi obtido a partir de talos de *C. substellata* extraído com éter dietílico e purificado em coluna de sílica Gel eluída com clorofórmio:hexano (80:20 v/v). O USNP foi obtido a partir de AU dissolvido em água, a 40°C, seguido por gotejamento KOH (10%) até a completa solubilização da amostra, e em seguida liofilizado e mantido a -80 °C. A estrutura das moléculas foi confirmada por análises de Infra Vermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN H⁺). Os embriões (n=100) foram expostos em soluções contendo 1 a 6 µg/mL de AU solubilizados em DMSO (0,5%), bem como USNP em água filtrada e decolorada, por 24 h. Após a exposição os embriões foram lavados com água filtrada decolorada e observados após 7 dias para verificação da viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). Os grupos controles continham água filtrada decolorada, água com DMSO a 0,5% e água com niclosamida (1µg/mL). O teste de toxicidade do AU foi realizado sobre *Artemia salina* nas concentrações de 1 a 4 µg/mL, por 24 h de exposição. Os resultados mostraram que o AU para os estádios de blástula ocasionou 51% de inviabilidade na concentração de 1,5 µg/mL e em gástrula de 72% na concentração de 4 µg/mL. Para os estádios de trocófora e véliger na concentração de 5 µg/mL foram observados 29 e 93% de inviabilidades respectivamente. Todos os estádios mostraram 100% de inviabilidade para o AU nas concentrações 2, 4,5, 6 e 6 µg/mL respectivamente. Enquanto que para o USNP o estágio de blástula na concentração de 5 µg/ml ocasionou 48% de inviabilidade, sendo resultado semelhante no estágio de gástrula na concentração de 3 µg/mL. Os estádios de trocófora e véliger apresentaram 27 e 26% de inviabilidade para a concentração de 2,5 µg/mL respectivamente. Os seguintes estádios mostraram 100% de inviabilidades para o USNP nas concentrações 6, 4, 4.5 e 4.5 µg/mL respectivamente. Para moluscos adulto o AU apresentou 53 e 87% de mortalidade nas concentrações de 2 e 3 µg/mL após 24 h de exposição e 90 e 100% nas concentrações de 2,5 e 3 µg/mL observados após 7 dias. A toxicidade para *A. salina* o ácido úsnico apresentou a partir da concentração de 2,5 µg/mL. Portanto, o estudo mostrou que o AU e o USNP demonstraram ser moléculas promissoras no controle ou eliminação da *B. glabrata*.

Palavras Chaves: *Cladonia substellata*; Ácido úsnico; Usnato de Potássio; Toxicidade; *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

ABSTRACT

In Brazil, Pernambuco is one of the states with the highest prevalence of schistosomiasis, a disease whose main vector is the *Biomphalaria glabrata*. Niclosamida is the main product used in Control *B. glabrata*, but due to toxicity its use compromises the aquatic ecosystem, making it important to search for alternative molluscicides and lower environmental toxicity such as usnic acid (UA) purified *Cladonia substellata* and its derivative potassium usnate (USNP). This study aimed to evaluate the embryotoxic activity UA and USNP on embryonic stages of *B. glabrata*. The UA was obtained from *C. substellata* extracted with diethyl ether and purified on silica gel column eluted with chloroform: hexane (80:20 v/v). The USNP was obtained from UA dissolved in water at 40 °C, followed by dropwise KOH (10%) until complete solubilization of the sample, and then lyophilized and kept at -80 °C. The structure of the molecules was confirmed by Infra-red (IR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). The embryos (n = 100) were exposed to solutions containing 1 to 6 µg/mL UA solubilised in DMSO (0.5%) and in USNP filtered and dechlorinated water for 24 h. After exposure the embryos were washed with filtered dechlorinated water and observed for 7 days to verify the viability (hatch) and unviable (death and malformed). The control groups contained filtered dechlorinated water, water with 0.5% DMSO and water with niclosamide (1µg/mL). The UA toxicity test was conducted on *Artemia salina* environmental bioindicator in concentrations from 1 to 4 (µg/mL) for 24 h of exposure. The results showed that the UA to the blastula stage resulted in the unviable of 51% concentration 1.5 µg/mL and the percentage of gastrula 72% at a concentration of 4 µg/mL. To trochophore and veliger stages in the concentration of 5 µg/mL were observed 29 and 93% unviable respectively. All stages showed 100% unviable for the UA in concentrations 2, 4.5, 6 and 6 µg/mL respectively. While the USNP to the blastula stage at a concentration of 5 µg/mL resulted in 48% of unviable, with similar result in the gastrula stage in the concentration of 3 µg/mL. To the trochophore and veliger stages 27 and 26% have unviable to concentration of 2.5 µg/mL respectively. The following stages showed 100% unviable USNP concentrations for 6, 4, 4.5 and 4.5 µg/mL respectively. For adult mollusks UA showed 53 and 87% mortality at concentrations of 2 and 3 µg/mL after 24 h exposure to 90 and 100% at concentrations of 2.5 and 3 µg/mL observed after 7 days. Regarding toxicity to *A. salina* UA showed significant toxicity values from the concentration of 2.5 µg/mL. Therefore, the study showed that the UA and USNP proved promising molecules in the control or elimination of *B. glabrata*.

Keywords: *Cladonia substellata*; usnic acid; potassium usnate; toxicity; *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1.** Países com altos e baixos índices de prevalência para esquistossomose no Mundo.....18
- Figura 2.** Distribuição da esquistossomose de acordo com faixa de prevalência, por município. Brasil.....19
- Figura 3.** Taxas da mortalidade por esquistossomose no Brasil, e em suas Regiões entre 2000 a 2011.....20
- Figura 4.** Focos dos hospedeiros intermediários *B. glabrata* e *B. straminea*, em áreas litorânea no estado de Pernambuco. Brasil.....21
- Figura 5.** Taxas da mortalidade por esquistossomose no Brasil, e em Pernambuco 1979 a 2010.....22
- Figura 6.** Ciclo evolutivo do *S. mansoni*.....23
- Figura 7.** *Biomphalaria*: Concha e massa cefalopodal, vistas pela direita (A), pela frente (B) e pela esquerda (C).....25
- Figura 8.** Distribuição geográfica da *B. tenagophila* (A), *B. straminea* (B) e *B. glabrata* (C) no Brasil.....27
- Figura 9.** Embriões da *B. glabrata* em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário: (A) blástula, (B) gástrula, (C) trocófora e (D) véliger.....29
- Figura 10.** Filamento do micobionte (*Parmotrema trictorum*) envolvendo células do fotobionte (*Trebouxia*) visto do microscópio (A). Fungo e alga na visão simbiótica (B).....33
- Figura 11.** Estrutura geral de um líquen, mostrando a organização estrutural em camadas.....33
- Figura 12.** Classificação dos talos liquênicos. (A) filamentoso, (B) crostoso, (C) folioso, (D) fruticoso, (E) esquamuloso, (F) dimórfico.....35

Figura 13. Talos de <i>Cladonia substellata</i> em seu ambiente natural, Mamanguape - Paraíba - Brasil.....	37
Figura 14. Estrutura do ácido úsnico e dos seus enantiômeros (A), L (-) e (B), D (+).....	38
Figura 15. Casal de <i>Artemia salina</i> Leach (A) Macho) e (B) Fêmea.....	43

ARTIGO 2

Figura 1. Usnic Acid Chemical Structure.....	62
Figura 2. <i>Biomphalaria glabrata</i> different embryonic stages.....	62
Figura 3. <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos exposed to different concentrations of usnic acid.....	62
Figura 4. Mortality of adult snails of <i>Biomphalaria glabrata</i> exposed to usnic acid.....	63
Figura 5. Usnic acid toxicity on <i>Artemia salina</i> Leach.....	63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

- Tabela 1.** *Bimphalaria glabrata* embryos mortality treated with usnic acid at different embryonary stages.....64
- Tabela 2.** Lethal Concentration to all embryonic stages and adult snails of *Biomphalaria glabrata* exposed to usnic acid.....64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Conceito e Histórico da Esquistossomose.....	17
2.2 Aspectos Epidemiológicos da Esquistossomose.....	18
2.3 Ciclo Evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
2.4 Hospedeiros Intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil.....	24
2.4.1 Características Embrionárias dos Moluscos do Gênero <i>Biomphalaria</i>	28
2.4.2 Métodos de Controle dos Hospedeiros Intermediários do <i>S. mansoni</i>	29
2.5 Líquens.....	33
2.5.1 <i>Cladonia substellata</i> Vanio.....	37
2.6 Testes ecotoxicológicos.....	41
2.6.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	42
3. OBJETIVOS.....	45
3.1 Geral.....	45
3.2 Específicos.....	45
4. ARTIGO 1. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	46
Background.....	47
Methods.....	47
Results and Conclusions.....	48
References.....	48
5. ARTIGO 2. Assessment of toxicity of usnic acid from <i>Cladonia substellata</i> on <i>Biomphalaria glabrata</i> vector of <i>Schistosoma mansoni</i> in different embryonic stages, adult snails and <i>Artemia salina</i>.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	51
Materials and Methods.....	52
Results and Discussion.....	55
Conclusions.....	58
References.....	58
6. CONCLUSÕES.....	65

REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS.....	84
Table 1. <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos mortality treated with usnate potassium at different embryonary stages.....	85
Table 2. Lethal Concentration to all embryonic stages and adult snails of <i>Biomphalaria glabrata</i> exposed to usnate potassium.....	85
Usnic Acid from <i>Cladonia substellata</i> as Schistosomiasis Vector Controls.....	86
Embryotoxicity of Usnic Acid and Potassium Usnate on <i>Biomphalaria glabrata</i> Vector of Schistosomiasis.....	87
Atividade Moluscicida do Ácido Úsnico sobre a <i>Biomphalaria glabrata</i> , (Say,1818).....	88
Avaliação da Atividade do Ácido Úsnico sobre Cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	89
Atividade dos Ácidos Liquênicos Salazínico e Barbático sobre Cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	90
Normas da Revista. Artigo 1. BMC Proceedings.....	91
Normas da Revista. Artigo 2. Chemosphere.....	95

1. INTRODUÇÃO

A Esquistossomose é uma doença infecto-parasitária, endêmica em 78 países e territórios do mundo entre Ásia, Américas e África. Esta doença continua sendo um grande problema de saúde pública e em escala mundial está entre as doenças parasitárias que continuam a aumentar (WHO, 2015).

No Brasil acredita-se que a doença chegou ao país no período da escravidão, onde uma das portas de entrada foi o estado de Pernambuco, que atualmente apresenta-se como um dos principais estados que mantêm altas estatísticas relacionadas a números de casos e mortes da doença (NOYA et al., 2015). No território pernambucano as áreas mais endêmicas para a doença encontram-se no Zona da Mata com expansão para áreas urbanas e mais recentemente encontra-se em cidades litorâneas (BARBOSA et al., 2014a,b; 2015; BARRETO et al., 2015).

A transmissão da esquistossomose está diretamente relacionada com a presença de vetores do gênero *Biomphalaria* que elimina cercárias, fase larval do parasito, no meio aquático (WHO, 2015). A infecção ocorre pela pele ou mucosas quando a pessoa tem o contato com coleções aquáticas contaminadas por cercárias, forma larval do parasita (REY, 2011). No Brasil esses vetores se encontram bastantes distribuídos entre os estados (SCHOLTE et al., 2012). Apesar de todos os esforços e conhecimentos há décadas da biologia e dos elementos que integram o ciclo de vida do parasita, esta doença continua a existir em diferentes regiões do nosso país e do mundo (GRYSEELS, 2012; MARTINS-MELO et al., 2014).

A *B. glabrata* é a espécie mais suscetível a se infectar com as linhagens geográficas do *S. mansoni*, constituindo-se o mais eficiente vetor da doença, tendo sido encontrado em ambientes naturais com taxa de positividade de mais de 80% (BARBOSA et al., 2014a). Esta espécie de molusco é amplamente distribuída e já foi notificada em 16 estados brasileiros (BRASIL, 2014). O seu desenvolvimento embrionário é relativamente curto, podendo eclodir seis a nove dias após a oviposição, alcançando a idade adulta e maturidade sexual em aproximadamente três meses. Por ser um animal hermafrodita a *B. glabrata* pode gerar milhões de novos descendentes nos primeiros meses de oviposição (KAWANO et al., 1995; 2008; PIERI et al., 2012).

Uma das ações recomendáveis pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para interromper o ciclo de transmissão do *S. mansoni* consiste na utilização de moluscidas cujo

objetivo e a diminuição da população dos moluscos hospedeiros intermediários (WHO, 1983). Atualmente o único moluscicida utilizado nos programas de controle das esquistossomíases no mundo é o niclosamida. Este produto sintético é altamente tóxico para todos os estádios de vidas do molusco, porém por não ser específico, acaba atingindo a flora e fauna aquática pressente no local. A utilização desde moluscicida só é permitida em condições especiais onde se deve ocorrer uma diminuição drástica e rápida na redução de transmissão da doença (PIERI et al., 2012).

Portanto, estudos estão voltados para descoberta de novos agentes moluscicidas que tenham um importante papel na diminuição dos números de caramujos, entre eles o gênero *Bimphalaria*, e que não sejam tóxicos para o meio ambiente (KING; BERTSCH 2015). No Brasil o advento com as primeiras pesquisas em busca de moluscicidas naturais ocorreram na década de 30. Nesta época foram demonstrados os resultados das atividades dos extratos aquosos do caule de *Sejania sp.* (cipó-timbó) e *Sapindus saponaria L.* (saboneteira) em *B. glabrata* (PINTO; ALMEIDA, 1994). Atualmente estudos realizados com substâncias originadas do líquen tem se mostrado bastante promissores. Estes metabólitos secundários tem desempenhado importante funções biológica como antiviral (SOKOLOV et al., 2012), antimicrobiana (KARABACAK, TAY, KIVANC, 2014), anti-inflamatória e antioxidante (SU et al., 2014), antiparasitária (LUZ et al., 2015) entre outras.

Neste contexto, o ácido úsnico e o seu derivado o usnato de potássio merecem grande atenção, por possuir propriedades biotecnológicas no entanto ainda não explorada quando direcionada a sua utilização como agentes embriotóxicos sobre a *B. glabrata*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Conceito e Histórico da Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária silenciosa considerada uma endemia mundial negligenciada, sendo encontrada nas regiões tropicais e subtropicais. É causada por platelmintos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, têm como principais agentes etiológicos as espécies *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mekongae* e *S. mansoni*. Esta última espécie é a única encontrada no continente Sul-americano responsável pela alta endemicidade (WHO, 2015). Popularmente esta patologia é conhecida como barriga d'água, xistosa ou doença do caramujo (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A afirmação das questões de quando e onde surgiram os primeiros casos de esquistossomose ainda não se encontram completamente esclarecidos. Acreditava-se pelos achados arqueológico que a doença era originária da China onde foram encontrados ovos do parasita em múmias egípcias, datados de 5.200 a.C. através de análises genéticas com o gênero *Schistosoma* observou-se que o mesmo tinha evoluído originalmente no continente asiático e se espalhado para o continente africano. Porém, pesquisas laboratoriais, podem mudar o que já tinham sido relatado sobre a origem da esquistossomose. Foram encontrados no vale do rio Eufrates, Oriente Médio, 26 esqueletos humanos, datados entre 6.500 a 6.000 anos a.C. Este material, após ter sido recolhido e analisados ficou evidenciado a presença de ovos do *S. haematobium* ou *S. intercalatum*. Com este resultado acredita-se que do rio Eufrates, a doença foi se dispersando para outros continentes por meios de transportes marítimos, permitindo assim o fluxo migratório dos agentes etiológicos da doença (ANASTASIOU et al., 2014). Segundo Olveda et al. (2014), a propagação da esquistossomose foi facilitada pela longevidade dos vermes adultos, em torno de 25 a 30 anos, grande capacidade de postura das fêmeas, existência de indivíduos eliminando ovos por muitos anos caracterizando o aspecto crônico da doença e a ampla distribuição dos hospedeiros intermediários.

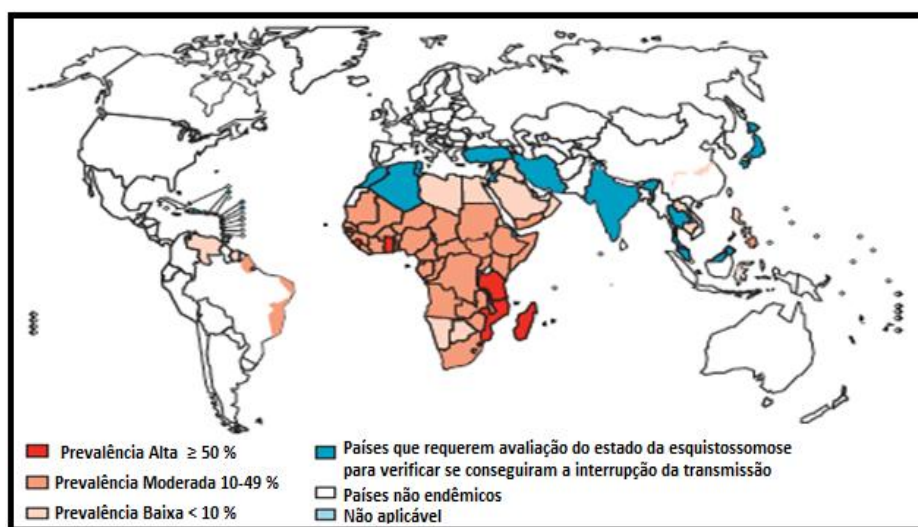
O agente etiológico da esquistossomose no Brasil foi delineado pela primeira vez, no ano 1907, pelo inglês Sambon, nomeando o parasita de *S. mansoni* em homenagem a Manson. Devido a pouca quantidade de vermes estudados surgiram dúvidas em relação à legitimidade do trabalho, apenas com as cautelosas observações de Pirajá da Silva, as incertezas taxonômicas foram todas esclarecidas. O reconhecimento científico deste pesquisador iniciou-

se em 1908, quando publicou no periódico *Brasil-Médico* na Bahia, os seus seis trabalhos sobre o verme *S. mansoni*, os mesmos também retratavam a ocorrência da esquistossomose no Brasil. A sua última publicação no ano de 1908, faz uma avaliação sobre os 20 primeiros casos humanos observados, suas manifestações clínicas, seu diagnóstico, e as características da espécie do parasito, desta forma os seus resultados causaram repercussão internacional consolidando os seus estudos sobre o verme (KATZ, 2008).

2.2 Aspectos Epidemiológicos da Esquistossomose

Atualmente a esquistossomose encontra-se presente em 78 países, sendo a sua maioria considerados endêmicos para a doença. Os maiores índices da doença apresentam-se nos continentes; Africano, Sul Americano, Leste do Mediterrâneo, Asiático e pontos isolados na Europa, com mais de 260 milhões de pessoas infectadas (Figura 1) (WHO, 2015). Estima-se que outras 800 milhões de pessoas estejam sob risco eminente de infecção (USEH, 2012). O tratamento para a doença é garantido em apenas 52 países, e o número de pessoas que necessitam de medicação em 2013 ultrapassam 260 milhões. Deste total, são de 46,4% crianças com idade escolar entre 5 a 14 anos de idade (WHO, 2015). Consequentemente há um alto número de óbitos anuais por causa da doença, aproximadamente 200,000 mil (WHO, 2016).

Figura 1. Distribuição geográfica da prevalência para esquistossomose no Mundo.

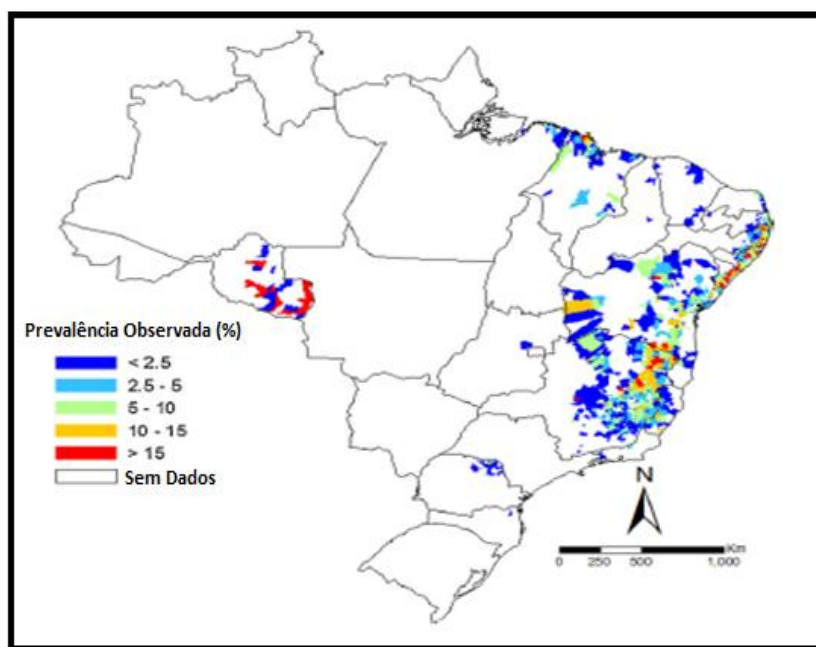


Fonte: BUSTINDUY et al. (2014)

No Brasil, estima-se que existam cerca de 6 milhões encontram-se infectados com o *S. mansoni*, principalmente nos Estados da Região do Nordeste e em Minas Gerais.

(LAMBERTUCCI, 2010). A transmissão da doença ocorre em 19 Estados (Figura 2), com diferentes faixas de prevalência, destacando-se Maranhão, Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte, Minas Gerais e Espírito Santo e em áreas com transmissão focal: Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal (BRASIL, 2010; SCHOLTER et al., 2014). Particularmente os Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, apresentam-se hiperendêmicos em relação a doença (MARTINS-MELO et al., 2014).

Figura 2. Distribuição da esquistossomose mansoni de acordo com faixa de prevalência, por município. Brasil.



Fonte: SCHOLTER et al. (2014)

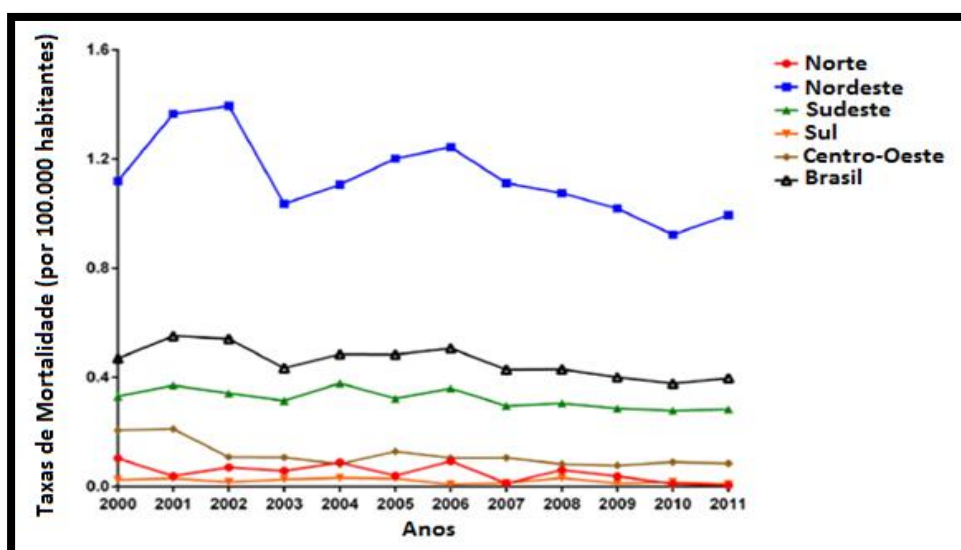
A esquistossomose no Nordeste do Brasil continua a ser um grave problema de saúde pública, apresentando uma das maiores áreas e números de casos da doença, ao longo de décadas, o estado de Pernambuco ocupa o terceiro lugar neste aspecto (BARRETO et al., 2015). A endemia tem possibilidade de expandir-se nesta região em decorrência da associação de fatores tais como vastas regiões agrícolas, com extensivos projetos de irrigação, propiciando um ambiente adequado para a proliferação dos moluscos transmissores da doença (LEAL-NETO et al., 2012) e socioambientais (GOMES et al., 2014).

A permanência ou aumento dos casos de esquistossomose em áreas urbanas (SILVA; DOMINGUES 2011; CARDIM et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; FAVRE et al., 2015) e

rurais (OLLIARO et al., 2011; VIDAL et al., 2011; BARBOZA et al., 2012; LEAL-NETO et al., 2012) no Brasil, evidencia que esta doença contribui como um dos fatores limitantes ao país que busca reconhecimento no desenvolvimento econômico e de infra-estrutura sanitária de qualidade.

Estudo realizado por Martins-Melo et al. (2014) sobre a temporalidade das taxas de mortalidade decorrente a esquistossomose no Brasil de 2000 a 2011 não demonstrou uma mudança significativa (Figura 3). Esta singular diminuição está diretamente relacionada aos programas de educação em saúde e o tratamento específico com drogas menos tóxicas, implementados nas áreas endêmicas (FAVRE et al., 2015). Mesmo com estes esforços os maiores números de óbitos atribuídos à doença no Brasil são oriundos da região Nordeste (MARTINS-MELO et al., 2014).

Figura 3. Taxas da mortalidade por esquistossomose mansônica no Brasil, e em suas Regiões entre 2000 a 2011.

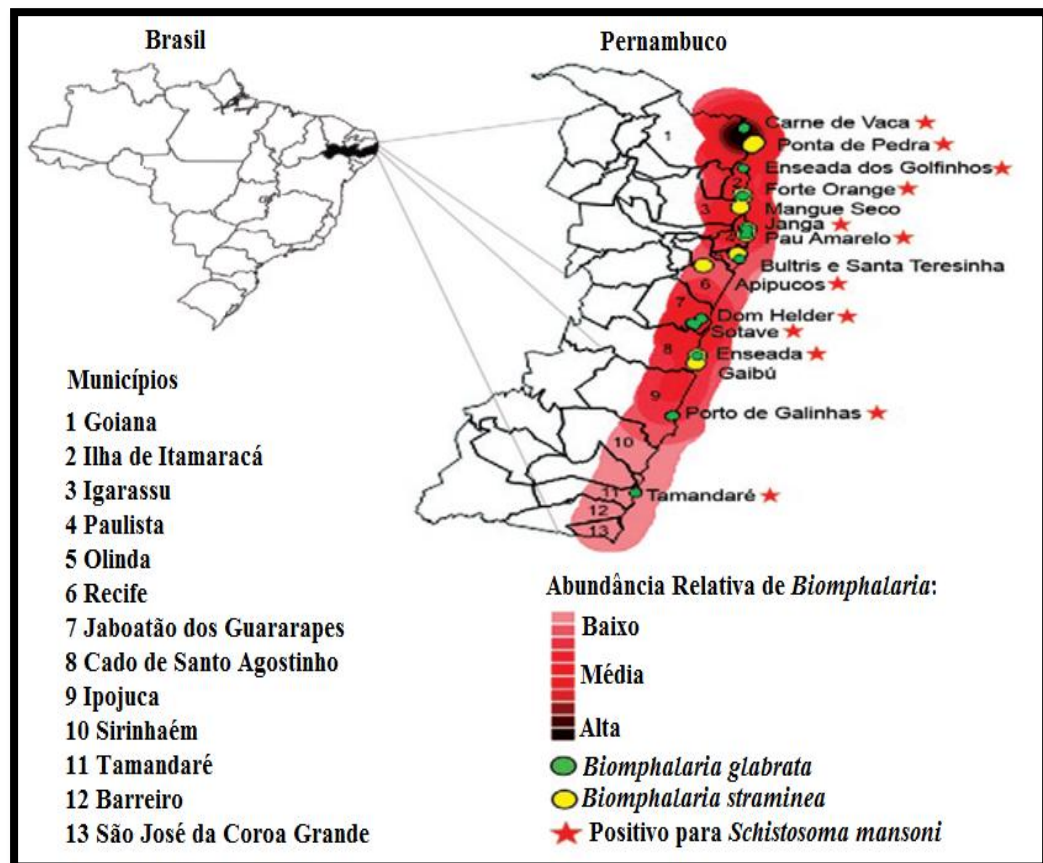


Fonte: MARTINS-MELO et al. (2014)

No Estado de Pernambuco, as áreas da Zona da Mata e do Litoral são endêmicas para a esquistossomose e apresentam duas espécies de hospedeiro intermediário, *Biomphalaria glabrata*, mais localizado na faixa litorânea (BARBOSA et al., 2014a), e *B. straminea*, distribuído por todo o Estado, com maior representatividade nas áreas rurais. (REY, 2011; LEAL NETO et al., 2012). Na década de 90 o Estado apresentou taxas de infecções humanas crescentes nas regiões da Zona da Mata, com até 80% dos indivíduos parasitados (BARRETO et al., 2015). Em 2011 aproximadamente 9 mil pernambucanos foram diagnosticados com

esquistossomose (PORTAL DETERMINANTE SOCIAL DA SAÚDE, 2013). A doença encontra-se distribuída em 93 dos 185 municípios do Estado. O que se observa é a expansão da esquistossomose através de análises geoespacial e malacológica em áreas litorâneas do Estado (Figura 4) (BARBOSA et al., 2010; 2015), e em áreas da Região Metropolitana do Recife (ARAÚJO et al., 2007; BARBOSA et al., 2013; 2014b; DUARTE et al., 2013) e da Zona da Mata (BARBOSA et al., 2012; LEAL-NETO et al., 2012). No litoral de Pernambuco os primeiros casos da doença foram consolidados em veranistas e residentes na Ilha de Itamaracá (GONÇALVES et al., 1991; BARBOSA et al., 2000), posteriormente em Porto de Galinhas (BARBOSA et al., 2001) e recentemente em Serrambi (BARBOSA et al., 2015).

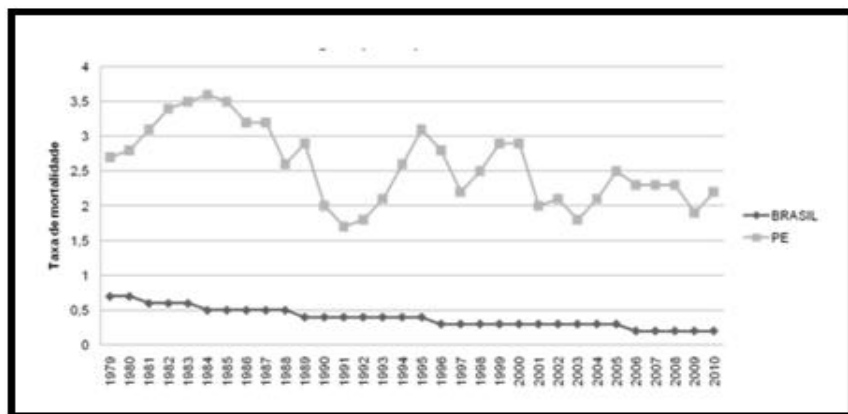
Figura 4. Focos dos hospedeiros intermediários *B. glabrata* e *B. straminea*, em áreas litorânea no estado de Pernambuco. Brasil.



Fonte: BARBOSA et al. (2010)

O estado de Pernambuco registra o maior número de óbitos relacionado a doença no país (Figura 5). Apenas no ano de 2010 foram registrados 358 óbitos, ou seja, cinco vezes maior que a média nacional (PERNAMBUCO, 2014).

Figura 5. Taxas da mortalidade por esquistossomose no Brasil, e em Pernambuco 1979 a 2010.



Fonte: PERNAMBUCO (2014)

2.3 Ciclo Evolutivo do *Schistosoma mansoni*

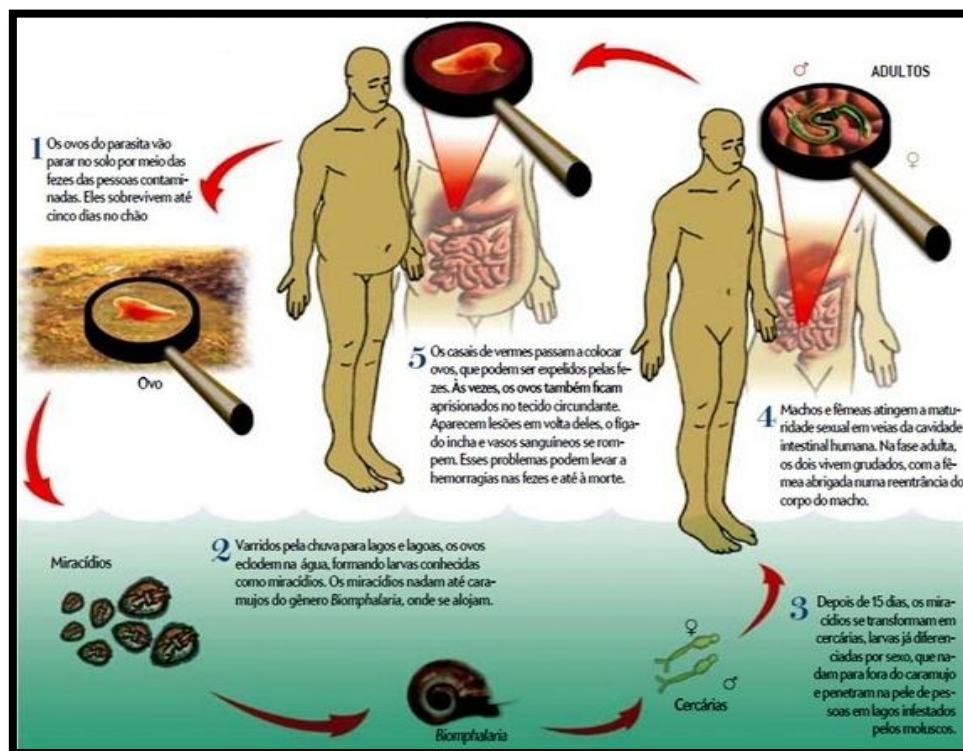
O *S. mansoni* taxonomicamente pertence ao Filo *Platelminto*, Classe *Trematoda*, Subclasse *Digenea*, Ordem *Strigeiformes*, Família *Schistosomatides*. Ele possui um ciclo de vida complexo, o que lhe caracteriza na Subclasse *Digenea*, obrigatoriamente o verme passar por dois ciclos de vida envolvendo um molusco aquático (gastropodes) como hospedeiro intermediário e um hospedeiro vertebrado definitivo, o homem (LEE et al., 2014). No ambiente natural ou silvestre o *S. mansoni* também pode infectar primatas, ruminantes, roedores, marsupiais (Gambá) estes animais são considerados hospedeiros permissivos responsáveis pela manutenção do ciclo do parasita no ambiente (CARVALHO; ANDRADE; CORTES, 1976; REY, 1993; GENTILE et al., 2012).

O ciclo do *S. mansoni* (Figura 6) se inicia quando o hospedeiro vertebrado infectado elimina os ovos maduros nas fezes, ao alcançar a água, eclodem e liberam larvas ciliadas denominadas miracídeos (primeiro estágio de vida livre do verme). Estas larvas nadam ativamente e penetram nos moluscos preferencialmente pela base das antenas ou pelo pé. Dentro do molusco transformam-se em esporocistos primários e secundários, por meio do processo de expansão clonal, podendo produzir mais de 100.000 cercárias oriundas de um único miracídio. Estas são sempre de um mesmo sexo, mas como frequentemente ocorrem múltiplas infecções, ambos os sexos podem ser representados na população cercariana. Quando os esporocistos estão maduros em torno de 25 a 35 dias após a infecção, eles são

eliminados do molusco assumindo a forma de cercárias (segunda fase de vida livre do verme) (KATZ; ALMEIDA, 2003; REY, 2011; NEVES, 2012).

Na pele do homem, a penetração ocorre pelas ações lítica e mecânica dos movimentos intensos da cercaria. Esta infecção ocorre em menos de 15 minutos e a cercária perde sua cauda e passa a ser chamada de esquistossômulo, estes penetram nos vasos sanguíneos ou nos vasos linfático do hospedeiro definitivo. Muitos deles são vencidos pelo sistema imune humano e os demais conseguem chegar até o coração e os pulmões. Posteriormente, migram para o sistema intra-hepático onde se alimentam e tornam-se adultos alcançando a maturidade em torno de 28 a 48 dias após a infecção. O macho mede cerca de 1 cm e a fêmea 1,5 cm, ambos tem cores esbranquiçadas. Em seguida, os vermes acasalam-se e a fêmea estala-se dentro do canal ginecóforo do macho, ambos migram para as veias mesentéricas onde a fêmea inicia a postura dos ovos individualmente em torno de 300 unidades por dia. Aproximadamente 70% dos ovos ganham a circulação e acumula-se no sistema porta hepático e/ou nas paredes do intestino, ocasionando a patologia da doença, os demais 30% podem depositar-se nas paredes intestinais, podendo alcançar a luz intestinal e serem eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo (KATZ; ALMEIDA, 2003; REY, 2011; NEVES, 2012).

Figura 6. Ciclo evolutivo do *S. mansoni*



Fonte: Scientific American Brasil (2011)

2.4 Hospedeiros Intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* pertencem ao Reino Animal, Filo *Mollusca*, Classe *Gastropoda*, Subclasse *Pulmonata*, Ordem *Basommatophora*, Família *Planorbidae* e Gênero *Biomphalaria* (LIMA, 1995). Este filo possui o maior numero de animais já catalogados e sua representatividade já ultrapassou mais de 110 mil espécies (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Existem 10 espécie e 1 subespécie do gênero *Biomphalaria* identificadas no Brasil, estando classificadas nas seguintes categorias:

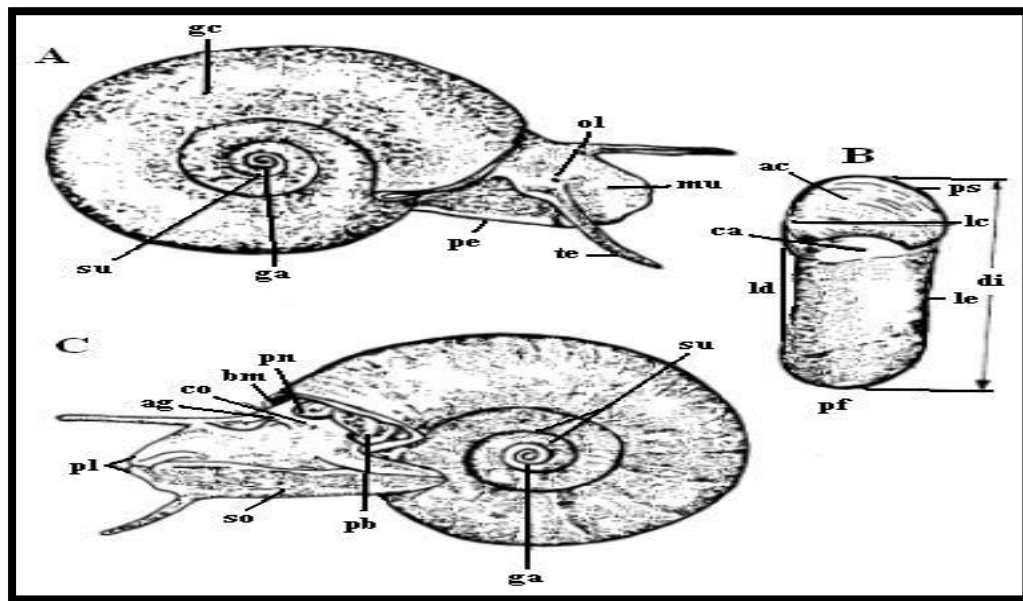
- a) hospedeiras naturais: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848);
- b) hospedeiras potenciais: *B. amazônica* (Paraense, 1966) e *B. peregrina* (Orbigny, 1835) ;
- c) não hospedeiras: *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *B. kuhniana* (Clessim, 1883), *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. oligoza* (Paraense, 1975), *B. occidentalis* (Paraense, 1981) e *B. tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984) (BRASIL, 2014).

Entre estas espécies, as mais estudadas no Brasil são as hospedeiras naturais devido o seu potencial de infecciosidade e transmitância da doença no país (SCHOLTE et al., 2012).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem o corpo revestido por uma concha calcária que serve de esqueleto e lhe confere proteção (Figura 7). Na cabeça do animal na parte posterior se delineia um par de tentáculos, um para o lado direito e o outro para o esquerdo, os mesmos são cilindros, filiformes, extensos e bastantes flexíveis, o que lhe confere o sentido tátil. Na base dos tentáculos são vistos os olhos e na parte anterior destaca-se a boca do molusco. A nutrição dos *Biomphalarias* é realizada por uma rádula fixa em uma mandíbula localiza no interior da boca (Figura 7). Os demais órgãos que constitui o sistema digestório são: esôfago e estômago, subdivididos em quatro porções: a) papo, dilatação terminal do esôfago; b) moela, órgão fortemente musculoso usado para triturar os alimentos com o auxílio de grãos de areia; c) piloro término do estômago e d) ceco, que coleta e elimina para o intestino as partículas não aproveitáveis. Entre o estômago e o ânus, encontra-se o reto. O sistema locomotor da classe *Gastropoda* acontece pela aderência do pé do animal ao substrato, as contrações musculares permitem a propagação do sentido posterior para o anterior, numa forma de ondas continuas. Em relação a respiração esses moluscos possuem

uma cavidade pulmonar, e uma pseudobrânquia, sendo altamente vascularizados, principalmente para facilitar a respiração dentro d'água (PARAENSE 1961,1972).

Figura 7. *Biomphalaria*. Concha e massa cefalopodal, vistas pela direita (A), pela frente (B) e pela esquerda (C) ac: abertura da concha; ag: abertura genital masculina; bm: borda do manto; ca: calo; co: colo; di: diâmetro da concha; ga: giro apical ou interno (primeiro giro); gc: giro corporal ou externo (último giro); lc: largura da concha; ld: lado direito; le: lado esquerdo; mu: mufla; ol: olho; pb: pseudobrânquia; pe: pé; pf: periferia; pl: palpos labiais; pn: pneumóstoma; ps: peristoma; so: sola do pé; su: sutura; te: tentáculo.



Fonte: KAWANO (1995)

O habitat natural dos moluscos *Biomphalaria* são as margens de coleções de água doce, rasas, de pouca correnteza ou águas paradas tais como: lagoas, lagos, remansos de rios, riachos, canais de irrigação ou qualquer área alagada. Em condições desfavoráveis estes moluscos podem exibir o seu mecanismo de proteção, como por exemplo em ambientes sujeitos a secas sazonais, os caramujos podem permanecer em estado de dormência prolongada, cobertos pelo substrato, por vários meses (anidrobiose). Com o retorno das condições propícias bióticas e abióticas; riqueza de microflora e matéria orgânica, baixa turbidez, alta luminosidade, pH, salinidade e temperatura os moluscos repovoam rapidamente os criadouros (LEAL-NETO et al., 2013). Outra característica importante deste caramujo é a forma de reprodução, por serem hermafrodita (apresentam órgãos sexuais masculino e feminino), são capazes de se autofecundar, ou seja, um único espécime pode originar mais de 10 milhões de descendentes em apenas 4 meses ou reproduzir-se por fecundação cruzada (PIERI et al., 2012). Sendo esta última forma, a preferencial quando estão em colônias.

Ainda em condições naturais a dieta alimentar dos caramujos é bastante diversificada, estando diretamente relacionado ao substrato encontrado no local; limo (contém algas, bactérias e outros microrganismos), lodo (rico em matéria orgânica e sais minerais), folhas e vegetais frescos e/ou em decomposição (PARENSE, 1972).

A identificação dos moluscos brasileiros do gênero *Biomphalaria* é dificultada principalmente pelo tamanho dos espécimes e semelhanças morfológicas existentes entre as espécies desse gênero. Entretanto essas dificuldades vêm incentivando a utilização de técnicas moleculares que possam auxiliar nos casos em que a morfologia comparativa e a anatomia não são conclusivas (SPATZ et al., 1998; VIDIGAL et al., 2000; DEJONG et al., 2001; ATTWOOD; HUO; QIU, 2015).

B. tenagophila tem entre 15mm a 35mm de diâmetro, com cerca de 7 a 8 giros carenados, mais acentuadamente no lado esquerdo, apresenta baixa capacidade de resistência à dessecação do ambiente e por isso, em geral, prolifera em corpos de água permanentes. Esta espécie encontram-se mais presente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Figura 8A), sendo consideradas muito importante na epidemiologia da esquistossomose nessas regiões (MASSARA et al., 2012; PINTO; MATI; MELO, 2013).

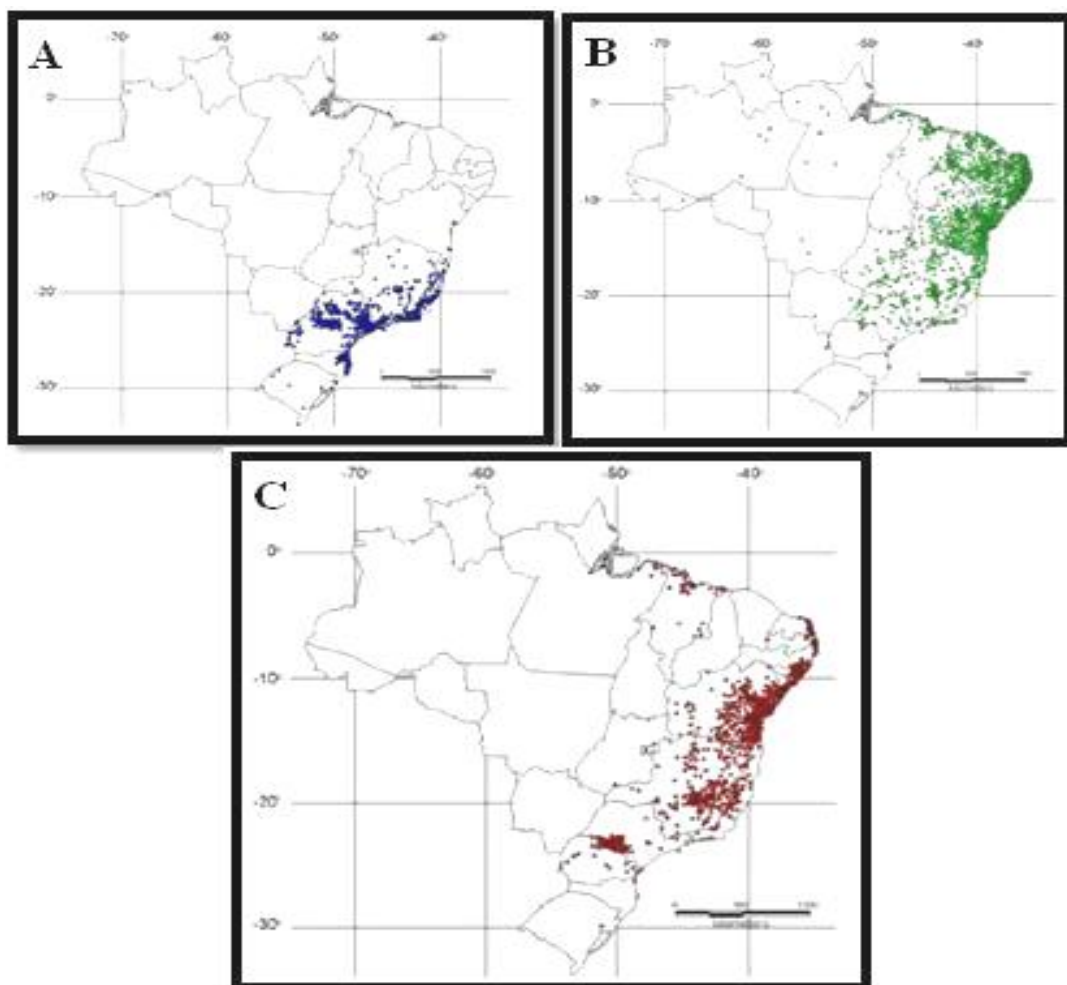
O *B. straminea* apresenta concha de 10mm a 16mm de diâmetro, com e cerca de 5 giros, apresenta distribuição geográfica mais ampla entre os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no território brasileiro (Figura 8B), estando presente em bacias hidrográficas que vão do Norte ao Sul do país (RAY, 2008), sua maior representatividade ocorre em áreas rurais, porém recentemente espécimes foram encontrados em áreas litorânea, ocasionado uma maior potencialidade de infecção (BARBOSA et al., 2014a; 2014b; 2015). Predominam no Nordeste brasileiro, tendo sido também responsável por focos no Pará, e em Goiânia. (REY, 2011). Os *B. straminea* preferem águas rasas de poucas correntezas, permanentes ou temporárias, suportando muito bem a dessecação dos ambientes aquáticos, devido ao processo de estivação (LEAL-NETO et al., 2012; BARBOSA et al., 2014a).

A espécie *B. glabrata* (Say, 1818), é considerada o maior molusco pertencente ao gênero, seu diâmetro de concha pode atingir de 20 a 40 mm de diâmetro e 08 a 11 mm de largura, com 6 a 7 giros arredondados (BRASIL, 2014). É considerada a principal espécie de hospedeiro intermediário da esquistossomose mansônica nas Américas, tendo sido encontrado em ambientes naturais com taxa de positividade de mais de 80% (BARBOSA et al., 2014b). Segundo Rey (2011), o *B. glabrata* é suscetível a se infectar com todas as linhagens

geográficas do *S. mansoni*. Em experimentos laboratoriais infecta-se facilmente em proporções próximas a 100% podendo liberar para o ambiente aquático em torno de 18 mil cercarias diariamente.

Esta espécie pode ser encontrados numa faixa contínua em todos os estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná com ponto isolado no Rio Grande do Sul, estando presente também em algumas áreas do Pará, Maranhão e Piauí (NEVES, 2012), (Figura 8C). O *B. glabrata* apresenta uma versatilidade e resistência em criadouros bastante importante, sendo capazes de se adaptarem as condições ambientais muito críticas, quando estas se tornam inadequadas ao seu desenvolvimento e permanência. (LEAL-NETO et al., 2013).

Figura 8. Distribuição geográfica da *B. tenagophila* (A), *B. straminea* (B) e *B. glabrata* (C) no Brasil.



Fonte: BRASIL (2014).

2.4.1. Características embrionárias dos moluscos do gênero *Biomphalaria*

O estudo da embriologia das espécies do gênero *Biomphalaria* torna-se importante, pois trata-se de uma fase do desenvolvimento do vetor que pode ser utilizada no combate a transmissão da esquistossomose. Em estudos experimentais algumas substâncias utilizadas como moluscidas não conseguem eliminar os moluscos nas fases embrionárias, logo ao eclodir eles podem vir a habitar novamente a região tratada. Pode-se citar como exemplo os extratos da Piperacea e da molécula isolada (halitoxin) de esponja marinha (*Axinella viridis*), eficiente no combate da forma adulta do *B. glabrata* e ineficaz frente aos embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (RAPADO et al., 2011; 2013a; MIYASATO et al., 2012).

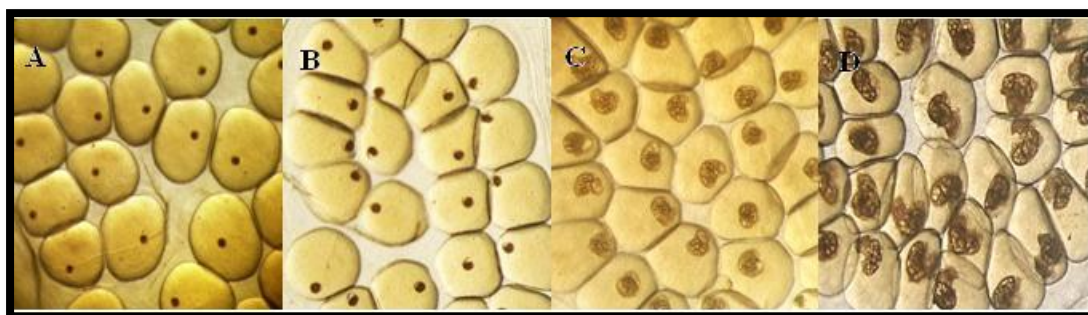
A embriologia dos moluscos *Biomphalaria* foi descrita por Camey; Verdonk (1969), Kawano; Okazaki; Ré (1992), Kawano; Nakano; Watanabe, (2008) que verificaram as existências dos seguintes estádios de desenvolvimentos embrionário: blástula, gástrula, trocófora e véliger.

Os moluscos *Biomphalaria* depositam suas desovas em superfícies rígidas, geralmente próximas a superfície da água. Estas desovas, no meio ambiente, chegam a ter 100 ovos ou mais; estes por sua vez, passam por diferentes estágios embrionários como citado anteriormente. Cada ovo maduro mede aproximadamente 100 µm de diâmetro e após a oviposição o ovo passa por diversas clivagens mitóticas até atingir o estágio de blástula, ou seja, 0 a 15 horas após a primeira (Figura 9A). O estágio de gástrula ocorre entre a 24^a a 39^a h após a primeira clivagem do ovo, caracteriza-se pelo fim da clivagem e início do crescimento, diferenciação e um pouco de movimentação celular. O tipo de gastrulação neste caramujo ocorre por invaginação. Inicialmente o embrião sofre uma mudança na sua morfologia, da forma arredondada para achatada isto no sentido do pólo animal para o pólo vegetativo. Na proporção que as células vão se movimentando para o interior, a concavidade irá aumentando, formando inicialmente uma abertura esférica que vai se fechando gradualmente. No final da gastrulação haverá o aparecimento da boca (Figura 9B) (CAMEY; VERDONK 1969); KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992); KAWANO; NAKANO; WATANABE 2008).

O estágio de trocófora ocorre entre a 48^a a 87^a h após a primeira clivagem (Figura 9C), nesta fase larval o embrião é caracterizado pela formação das regiões que separa as partes pré-trocal e pós-trocal. Na região pré-trocal encontra-se a futura região cefálica com a presença da

placa apical, futura região dos olhos e tentáculos e da vesícula cerebral. Enquanto na região pós-trocal encontra-se a boca, situada abaixo da placa apical e na região oposta encontra-se a glândula da concha. O estágio de véliger ocorre entre 96^a a 111^a h após a primeira clivagem. Este estágio se caracteriza pela alta movimentação embrionária dentro do ovo e a formação quase completa de um caramujo jovem (Figura 9D). Nas 120^a h finais, hipo stage, ocorre a formação da concha que começa a cobrir uma parte do corpo e do pé, sendo evidenciado o início da assimetria pelo desvio da concha para o lado direito, ainda nesta fase embrionária ocorre o aparecimento de tentáculos bem desenvolvidos e dos olhos, que, a princípio, se evidenciam como um halo pigmentado na região das placas cefálicas. Neste estágio há a formação quase completa de um caramujo jovem. A partir do sexto dia após a primeira clivagem, a temperatura de 25 °C os caramujo podem eclodir das desovas (CAMEY; VERDONK 1969); KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992); KAWANO; NAKANO; WATANABE 2008).

Figura 9. Embriões da *B. glabrata* em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário: (A) blástula, (B) gástrula, (C) trocófora e (D) véliger.



Fonte: AUTOR (2015)

2.4.2 Métodos de Controle dos Hospedeiros Intermediários do *Schistosoma mansoni*

O controle dos caramujos do gênero *Biomphalaria* é bastante dificultado por suas características intrínsecas e meios que utilizam para sobreviver quando em condições ambientais adversas. Algumas características destes moluscos podem ser referenciadas como a taxa de reprodução muito elevada, capacidade de repovoar criadores após tratamento químico, sobrevivência e resistência a dessecação (temperatura, estivação, pH e salinidade),

alimentação onívora e adaptações respiratórias (branquial em ambiente aquático e pulmonar no ambiente terrestre) (LEAL-NETO et al., 2013). Porém apesar de conhecer todas essas características adaptativas, existem o desejo de realizar o seu controle populacional no ambiente onde vive.

Os métodos ambientais para o controle populacional dos moluscos vetores da esquistossomose consistem na eliminação de todas as condições mínimas possíveis que venham favorecer a instalação, permanência ou manutenção do ciclo do parasita ou do molusco, porque a presença do vetor no ambiente caracteriza-se como um potencializador da doença (LEAL-NETO et al., 2013). As intervenções ambientais devem ser direcionadas principalmente aos serviços públicos de saneamento ambiental e básico (esgotamento sanitário tratado), este método pode ocasionar mudanças bruscas no ambiente para eliminação dos fatores responsáveis pelo ciclo da doença, outras ações também podem ser realizadas como a pavimentação de ruas, aterros e canalização dos rios (BARBOSA et al., 2011).

Em relação aos métodos biológicos, devido os milhares de casos de esquistossomose no mundo ao longo do tempo, fez com que despertassem o interesse técnico-científicos em linhas de pesquisas cujas alternativas não utilizam agentes químicos tóxicos para realizar o controle biológicos do vetor da doença (DAOUST et al., 2010). O controle biológico é feito com a introdução de um agente antagônico, cuja finalidade é diminuir o crescimento populacional do caramujo, geralmente isso ocorrerá pela competição do mesmo habitat. Na literatura a varias décadas já se tem conhecimento dos diversos organismos que foram utilizados como controle biológico do vetor da esquistossomose, animais vertebrados como peixes *Tilapia melanopleura*, *Astronotus ocellatus*, tartaruga e aves aquáticas (patos e marrecos) entre os predadores invertebrados *Helobdella triserialis lineata* (Hirudinea) e moluscos *B. straminea* e *Marisa cornuarietis* também foram utilizados no controle biológico da *B. glabrata* (POINTIER, 1993; BARBOSA; BARBOSA, 1995; POINTIER; DAVID, 2004; DAOUST et al., 2010).

No entanto, desde o ano de 1980 a OMS desaconselha o controle biológico através de introdução de espécies competidoras, predadoras ou patogênicas, justificando-se que não se pode mensurar as possíveis consequências ecológicas da introdução dessas espécies exóticas ou mesmo silvestre nos ambientes naturais, principalmente por esses organismos não pertencerem ao seu ecossistema natural (PIERI et al., 2012).

Os métodos químicos consistem na utilização de produtos químicos ou semi-sintético de origem animal ou vegetal denominadas de moluscidas, ou seja, são utilizados na eliminação dos moluscos. Dentre os mais de 7.000 produtos químicos que já foram testados no controle populacional dos vetores da esquistossomose alguns merecem destaque como o sulfato de cobre, Gramaxone, hidróxido de cálcio e Frescon (NEVES, 2012).

Atualmente o moluscida sintético niclosamida (Bayluscid), é utilizado em ocasiões especiais quando se busca reduzir de forma rápida a transmissão da doença, o mesmo possui alta toxicidade para os moluscos na concentração de 1 mg/L, causando 100% de mortalidade para os vetores se o contato for no mínimo por 8 h. Porém, o uso deste produto tem gerado preocupação em relação a alguns fatores tais como: desenvolvimento de resistência dos caramujos, baixa seletividade (atuam sobre outras espécies da fauna e da flora causando uma significativa alteração no ecossistema aquático) e o custo elevado desses produtos, considerados inviáveis principalmente aos países de terceiro mundo onde a doença é endêmica e existe escassez de recursos financeiro (CANTANHEDE et al., 2010).

No Brasil, mesmo com as constantes queimadas e os freqüentes desmatamentos, o país ainda é considerado mundialmente o que apresenta uma maior biodiversidade de flora, proporcionalmente oferece uma grande variabilidade genética. Pressupõe que menos de 10% dessas espécies tenham sido pesquisadas cientificamente quanto aos seus potenciais biológicos e menos ainda, em torno de 5% quando relacionados aos seus estudos detalhados em relação aos seus compostos fitoquímicos (primários e secundários). Assim a busca por novas substâncias moluscidas de origem natural merece destaque (LUNA et al., 2005; CATANHEDE et al., 2010). O advento no Brasil com as pesquisas voltadas em busca de moluscidas de origem natural são desde a década de 30, os primeiros testes demonstraram bons resultados de atividade de extratos aquosos do caule de *Sejania sp.* (cipó-timbó) e *Sapindus saponaria L.* (saboneteira) sobre espécie de *B. glabrata* (PINTO, ALMEIDA 1994). Atualmente esta linha de pesquisa encontra-se bastante fortalecida, cujo principal objetivo é a descoberta de novos agentes moluscidas que tenham um importante papel na diminuição dos números de caramujos, do gênero *Biomphalaria*, e que não sejam tóxicos para o meio ambiente (RAPADO et al., 2013b). Desta forma, a busca por moluscidas naturais ganhou um novo destaque, visando à obtenção de um produto alternativo mais barato, biodegradável, seguro (armazenamento, transporte e aplicação) e disponível localmente para o controle das populações de caramujos (MARTINS et al., 2014).

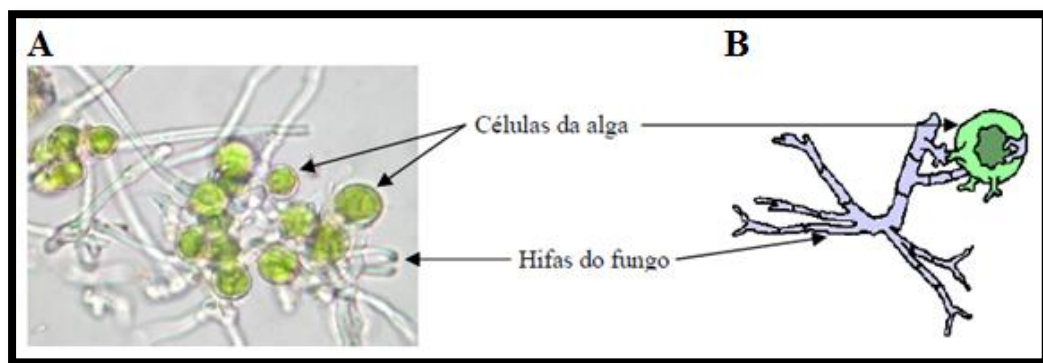
De maneira em geral a metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1965) especifica que as substancias de origem natural dotados de moléculas biologicamente ativa possam ser utilizados sem causar ônus ou desequilíbrio ao meio ambiente. As suas especificações classificam as substâncias naturais como inativas quando a percentagem de mortalidade dos moluscos corresponde de 0 a 30%, sendo considerados parcialmente ativo e ativo quando causam 40 a 60 % e 70 a 100 % de mortalidade dos moluscos respectivamente. Ainda de acordo com a OMS (WHO, 1983), moluscidas de origem natural devem considerar suas moléculas bioativas quando as mesmas obterem no mínimo 90% de mortalidade nas concentrações de no máximo 20 µg/mL para moléculas isoladas ou puras e 100 µg/mL para os extratos brutos.

Atualmente há intensificação na busca de produtos naturais com diferentes atividades biocidas, pois tais substâncias apresentam-se como alternativa viável, sendo matérias-primas para os derivados semi-naturais ou síntese (BRASIL, 2006). Muitos destes produtos preencherem requisitos como biodegradabilidade, menor impacto ambiental e menor custo (RAPADO et al., 2013b; KING, BERTSCH 2015). Existem muitas espécies de plantas tropicais que possuem substâncias com atividade moluscidas, estas são representadas por Al-Zanbagi et al., (2013) e Rocha et al., (2013). Em relação aos testes moluscidas encontramos na literatura de origem liquenica em condições laboratoriais utilizando molécula isolada e extrato sobre a *B. glabrata* e para o estágio de blástula, podemos citar o extrato etéreo e o ácido barbático (metabólito secundário da espécie *Cladia aggregata*) e o derivado do ácido úsnico o sal de potássio. Os resultados demonstram que o extrato etéreo e o ácido barbático purificado foram moluscidas (caramujos adultos) nas concentrações de 20 e 25 µg/mL, sendo que a atividade sobre embriões no estágio de blástula apenas o extrato etéreo mostrou ser embriotóxico nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Enquanto o usnato de potássio derivado do ácido úsnico apresentou atividade moluscida com 100% de mortalidade sobre a *B. glabrata* em 1 µg/mL e sobre o estágio de blastula 50% de inviáveis (malformados e mortos) numa concentração de 5.77 µg/mL (MARTINS, 2013; MARTINS et al., 2014).

2.5 Líquens

Os líquens ou fungos liquenizados são simbioses, cuja associação envolve organismos microscópicos em sua estrutura que são os fungos (micobionte, heterotrófico) e algas verdes ou cianobactéria (fotobionte, autotrófico) (Figura 10) (WEERAKOON, 2015).

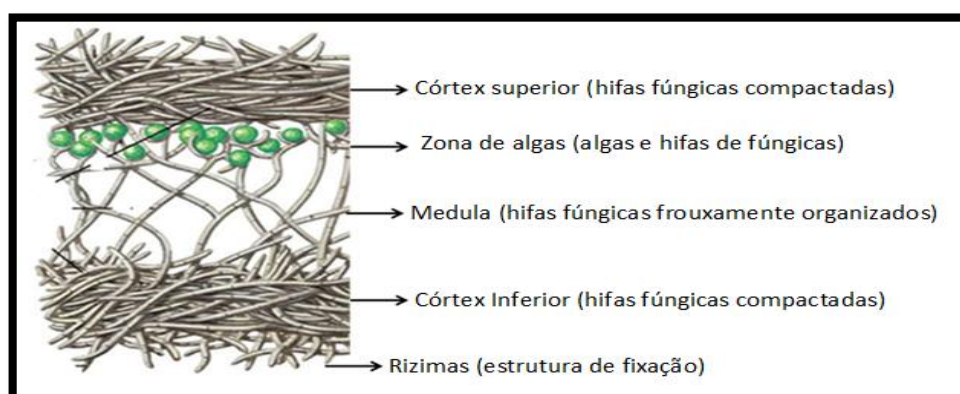
Figura 10. Filamento do micobionte (*Parmotrema trictorum*) envolvendo células do fotobionte (*Trebouxia*) visto do microscópio (A). Fungo e alga na visão simbiótica (B).



Fonte: SPIELMANN (2006).

A estrutura e o crescimento do talo líquênico é proveniente dessa simbiose, isto acontece pela presença de milhões de fotobiontes encontrados entre as hifas do micélio do micobionte, constituindo desta forma uma minicomunidade (Figura 11). Os fungos fornecem proteção e nutrientes as algas verdes e/ou cianobactérias que em contrapartida fornecem para os fungos açúcares oriundos do seu metabolismo fotossintético (BATES et al., 2011; MUSHEGIAN et al., 2011).

Figura 11. Estrutura geral de um líquen, mostrando a organização estrutural em camadas



Fonte: plantscience4u.com (2015).

Há evidências que os líquens surgiram no período pré-cambriano, esta hipótese encontra-se baseada pelas análises tridimensional das hifas encontradas no fotobionte. Geologicamente os líquens pré-cambrianos são morfologicamente semelhantes às formas atuais dos líquens (TAYLOR; KRINGS; TAYLOR, 2015). Na natureza os mais de 20 mil líquens identificados são altamente adaptativos, sendo encontrados em praticamente todos os tipos e modelos de ambientes, mesmos os considerados mais hostis que vão desde a Antártica, Tundra Ártica e climas deserticos (BJERKE et al., 2005; FERNANDES; SPIELMANN; OLIVEIRA, 2014; KOSANIĆ et al., 2014; RAVAGLIA et al., 2014).

Os líquens são classificados em cinco grupos, esta classificação é realizada a partir do Reino Fungi, 98% dos líquens pertencente ao filo *Ascomycota* e os demais ao filo *Basidiomycota* (WEERAKOON, 2015). Os fungos são os responsáveis pelo crescimento e diferenciação dos tipos de talos liquênicos, sendo eles:

- Os talos filamentosos: apresentam uma estrutura de talos simples, sendo constituída por filamentos frouxos e entrelaçados (Figura 12A).
- Talos crostosos, apresentam uma estrutura anatômica bem diferenciada, sua estrutura é dorsiventral, são geralmente achatados e aderidos ao substrato, formando uma espécie de “crostas” (Figura 12B).
- Os talos foliosos: apresentam semelhanças com os talos crostosos por apresentar a mesma estrutura dorsiventral, entretanto são menos aderidos ao substrato porque apresentam na sua estrutura morfológica o córtex inferior. Este tipo de talo ainda apresenta-se dividido em arredondada (lobos) ou alongadas (lacínias) e a sua fixação ao substrato ocorre através das rizinas (Figura 12C).
- Os talos fruticosos: são os mais diversificados, podem aparecer nos ramos com uma estrutura simples ou divididos, com formas cilíndricas ou achatados, ereto, pendente ou prostrado e apresenta uma estrutura radial ou isolateral. Os talos fixam-se ao substrato por um ou mais pontos do ramo (Figura 12D).
- Por fim os talos esquamuloso: apresenta uma estrutura anatômica assemelhando-se a escamas agregadas aos talos (Figura 12E). Talos dimórficos como o próprio nome diz apresenta uma estrutura com a combinação de dois talos crostoso-fruticoso ou escamoso-fruticoso (Figura 12F) (SPIELMANN, 2006; WEERAKOON, 2015).

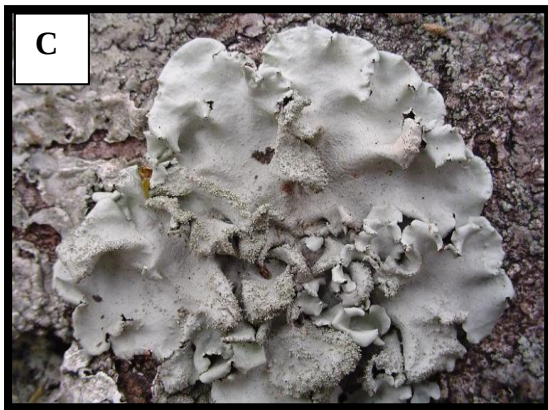
Figura 12. Classificação dos talos liquênicos. A. filamentosos, B. crostoso, C. folioso, D. fruticoso, E. esquamuloso, F. dimórfico.



Dictyonema glabratum (Spreng.) D. Hawksw.



Diploschistes gypsaceus (Ach.) Zahlbr.



Parmotrema tinctorum (Despr. ex Nyl.) Hale.



Teloschistes exilis (Michx.) Vain.



Normandina pulchella (Borrer) Nyl.



Cladonia vulcanica Zoll. & Moritzi.

Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 03.06.2015

Os líquens presentes nos ecossistemas desempenham importantes funções, participando desde a cadeia alimentar de invertebrados (VATNE; ASPLUND; GAUSLAA, 2011) e na formação e fertilização do solo, isto devido as secreções ácidas lançados sobre as rochas permitindo o seu deterioramento (ÖZVAN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015), eles também são excelente modelo para monitoramento da qualidade do ar (GERDOL et al., 2014; M_CMURREY; ROBERTS; GEISER, 2015; PAOLI et al., 2015; WAT; FORBES 2015).

Os líquens possuem uma fonte exclusiva de compostos polifenóis, biossintetizados pela via acetato-polimalonato, ácido chiquímico e vias de ácido mevalônico. Estas vias formam estruturas moleculares de origem natural que permite uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas. Atualmente mais de 850 metabólitos secundários já foram isolados de líquens, sendo 80% destes relatados exclusivamente para eles. Entre os seus compostos presentes os mais comuns são, mononuclear, aromáticos, depsídeos, depsídones, éteres difenil, e dibenzofuranos (YOUSUF; CHOUDHARY; ATTA-UR-RAHMAN, 2014).

Os metabólitos oriundos dessa simbiose são caracterizados em intracelular (primários) e extracelular (secundários), a sua distinção acontece onde os mesmos são biosintetizados no talo do líquen. Os intracelulares correspondem aos carboidratos, aminoácidos (alanina e ácido glutâmico são predominantes), proteínas, vitaminas e pigmentos (xantofila, clorofila e carotenos). Os extracelulares são representados pelas substâncias liquênicas, tem como exemplo: ácidos picrolíquênico, lecanórico, liquesterínico, atranorina, protocetrário, fumarprotocetrário, salazínico, divaricático, úsnico etc (CULBERSON, 1972; HONDA; VILEGAS, 1998).

Na literatura relata-se diversas utilidades dos metabólitos secundários produzidos pelos líquens, sendo utilizados comercialmente em perfumes, corantes, especiarias, medicamentos entre outros (YOUSUF; CHOUDHARY; ATTA-UR-RAHMAN, 2014). Importantes propriedades biológicas também são relatadas na utilização dos metabólitos secundários de líquens tais como antifúngica (GAZZANO et al., 2013; CHANG et al., 2015), antioxidante (KÖHLHARDT-FLOEHR et al., 2010; GHATE et al., 2013; ALVES et al., 2014;), antitumoral (RUSSO et al., 2012; KOSANIĆ et al., 2014; MUNIZ et al., 2015), antibacteriana (MANOJLOVIĆ et al., 2012; BELLIO et al., 2015) entre outras.

2.5.1 *Cladonia substellata* Vainio

A espécie *Cladonia substellata* pertence a família das *Cladoniaceae* onde são incluídas mais de 400 espécie, sendo encontradas em todos os continentes terrestres principalmente nas regiões neotropicais. Estas espécies são bem visíveis e facilmente reconhecido por causa de suas cores viva, apresentando talos dimórficos que crescem entre 15 a 48 centímetros de altura. Nas regiões neotropical do Mundo o gênero *Cladonia* são bem comuns, em algumas áreas são consideradas endêmicas, no Brasil a espécie *Cladonia substellata* encontra-se presente nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (AHTI; STENROOS; FILHO, 1993; AHTI, 2000).

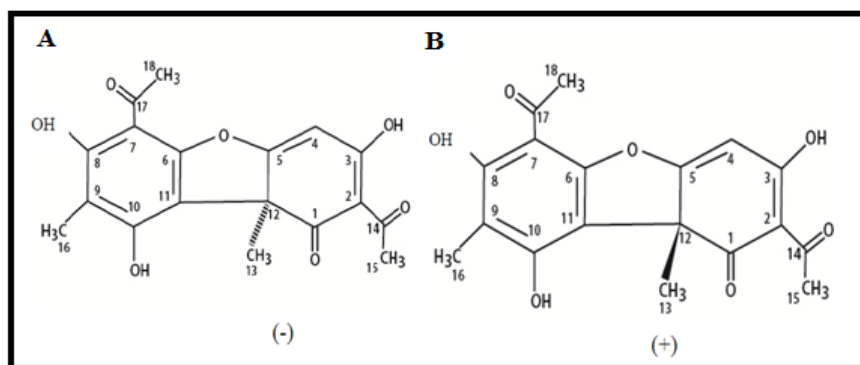
Figura 13. Talos de *Cladonia substellata* em seu ambiente natural, Mamanguape - Paraíba - Brasil.



Fonte: AUTOR (2015).

Os metabólitos secundários biossintetizados pela *C. substellata* são os ácidos: estístico, constístico, *norstictico*, *connorstictico* e *úsnico* (AHTI et al 1993). Este último ácido também denominado [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9α/βH) dibenzofurandiona (Figura 14) possui uma singularidade entre os demais constituintes do talo líquênico, apresentando-se como composto majoritário nos gêneros *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Parmelia* e *Evernia*. Na espécie *C. substellata* o ácido úsnico purificado chega a equivaler proporcionalmente a quase 7% do peso do talo líquênico. Uma das características dessa molécula é que a mesma é encontrada na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+), isto depende da projeção do grupo metil angular posicionado no carbono quiral 9 (PROKSA et al., 1994; COCCHIETTO et al., 2002).

Figura 14: Estrutura do ácido úsnico e dos seus enantiômeros (A), L (-) e (B), D (+).



Fonte: COCCHIETTO (2002).

A molécula do ácido úsnico apresenta caráter hidrofóbico, sendo insolúvel em água e glicerol. É parcialmente solúvel em etanol e facilmente diluído em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio. O seu hidrofobismo acontece pela presença dos quatros grupos funcionais cetônicos e do anel furano que uni os dois anéis aromáticos presente na estrutura molecular. Os seus cristais geralmente apresenta-se com coloração amarela, e as suas formas podem ser variadas, isto depende diretamente do solvente utilizado na sua recristalização, estes cristais apresentam um alto ponto de fusão em torno de 203 °C (ASAHINA, SHIBATA 1954; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

De acordo com os relatos disponíveis na literatura as investigações iniciais de aplicações com o ácido úsnico iniciaram na década de 50, estas pesquisas experimentais objetivaram a busca de novos antibióticos (COCCHIETTO et al., 2002). Paralelamente na mesma década foi realizado o teste antifúngico com a espécie *Trycophyton mentagrophytes*, após o tratamento foi observado a inibição do crescimento do fungo (BUSTINZA, 1951). Posteriormente Proska et al. (1996) observaram a inibição no crescimento dos fungos *Penicillium frequentas* e *Verticillium albo-atrum*, após o tratamento com o ácido úsnico.

Sokolov et al. (2012) realizaram pela primeira vez a atividade antiviral do ácido úsnico e dos seus derivados contra o vírus gripe A (H1N1), bem como, sua citotoxicidade. Foram utilizados 26 compostos que representaram as formas isoméricas do ácido úsnico (+) e (-) e os seus derivados. Os resultados mais interessantes foram obtidos para a forma oxidada dos derivados de ácido úsnico (+), sintetizado com perácidos orgânicos. Foi evidenciado uma alta

atividade inibitória do vírus, enquanto a citotoxicidade foi baixa, estes resultados evidenciam uma seletividade.

Leandro et al. (2013) avaliaram o efeito genotóxicos *in vivo*, do tratamento do ácido úsnico associado com o metanossulfonato de metila. A pesquisa constatou uma redução de 53, 81% aos danos cromossômicos e no genoma dos ratos quando comparados com os animais tratados apenas com o ácido úsnico em dosagem de 200 mg/kg. Este resultado demonstra a atividade antígeno-tóxico do ácido úsnico e da importância da associação de substâncias.

Estudo realizado por Su et al., 2014 *in vivo* mostrou excelentes resultados com o pré-tratamento com o ácido úsnico. O qual suprimiu as respostas inflamatórias em ratos com lesão pulmonar aguda induzida pelo lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas. Os resultados mostraram que o ácido úsnico nas concentrações de 50 e 100 mg/kg reduziu o edema pulmonar de forma significativa, aumentado a permeabilidade vascular dos pulmões, assim como, as atividades da superóxido desmutase e da glutatona, ocorrendo também a diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio, mieloperoxidase e malondialdeído nos tecidos pulmonares.

Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de polímeros colóides de (+)- ácido úsnico ligados ao cloreto de vinilbenzil proporciona maior área de contacto com as células bacterianas e também potencializa a atividade antimicrobiana. Estes polímeros colóides foram testado contra os microrganismo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Os resultados mostraram uma elevada atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos com valores de concentração mínima inibitória inferior a 0,12 mg/mL. As espécies *P. aeruginosa* e *E. coli* mostraram serem os microrganismos mais sensíveis em relação aos outros. A atividade bactericida para ambas foram de 0,94 e 3,75 mg/mL, respectivamente (KARABACAK, TAY, KIVANC, 2014).

Martinelli et al. (2014) desenvolveram uma técnica de sistemas de entrega controlada de fármaco a base de biofilme, em que, o principal objetivo da técnica é para profilaxias de infecções bacterianas. A micropartícula de polímero, à base de poli carboxilado, foi responsável para carrear o ácido úsnico encapsulado em micropartículas, sendo o resultado satisfatório. A entrega do fármaco em 80%, obteve a morte da bactéria *Staphylococcus epidermidis* em 24 h.

O ácido úsnico quando utilizado como suplemento dietético para perda de peso, pode acarretar sérios problemas de saúde, o mesmo tem sido associada a doenças hepáticas graves em alguns indivíduos. Joseph et al. (2009) conduziram uma pesquisa experimental cujo objetivo foi avaliar os mecanismos de ação do ácido úsnico e os seus efeitos sobre as mitocôndrias, os parâmetros analisados foram medição da taxa de consumo de oxigênio e/ou geração da (ATP) adenosina trifosfato associados com a estrutura mitocondrial e funções no fígado de ratas fêmeas B6C3F1. A dieta isolada iniciou na 8ª semana de idade, as ratas receberam ácido úsnico nas concentrações de 0, 60, 180, e 600 µg/mL, durante 14 dias. As análises mostraram um efeito significativo do ácido úsnico sobre a expressão de vários genes apenas na concentração mais elevada. Os resultados mostraram que ocorreu uma indução significativa dos genes associados aos complexos I a IV da cadeia transportadora de elétrons, como também vários genes envolvidos na oxidação dos ácidos graxos, no ciclo de Krebs, na apoptose, e nos transportadores de membrana também foram expressos. Uma das características da molécula do ácido úsnico é que a mesma é lipofílica podendo difundir-se através das membranas mitocondriais e provocar uma fuga de prótons (desacoplamento). Supõe-se que a indução da oxidação dos ácidos graxos e do ciclo de Krebs pode ser uma resposta adaptativa/ mecanismo de compensação devido o desacoplamento da membrana interna mitocondrial.

Atualmente, o interesse pelo conhecimento do ácido úsnico em outras áreas científicas, como por exemplo, na biomédica (SU et al., 2014; IORDACHE et al., 2015), farmacologia (GRUMEZESCU et al., 2014; KARABACAK, TAY, KIVANC, 2014; SHTRO et al., 2014) e na nanotecnologia (SANTOS et al., 2005; 2006; TARESCO et al., 2015) vem aumentando consideravelmente.

Em relação a pesquisa do ácido úsnico como agente moluscicida e a sua importância em utilizá-lo como um possível químico no controle da esquistossomose ainda não foi investigada, nenhum dado foi descrito na literatura em relação a esta atividade.

Nesta conjuntura também é necessário realizar experimentalmente testes de toxicidade do ácido úsnico com bioindicadores de referências. Em 1993 a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993) estabeleceu novos regulamentos para realização de *screening* para moluscidas e recomendou testes de toxicidade e bioatividade das moléculas investigadas que possam ser calculadas estatisticamente os valores de mortalidade da concentração letal para 50 % (CL₅₀) e 90 % (CL₉₀) dos moluscos, sendo as mesmas expressas em µg/mL.

Embora moluscicidas naturais sejam biodegradáveis, os extratos ou moléculas isoladas podem revelar riscos, mesmo que estejam em concentrações exigidas pela OMS (WHO, 1965). Nesse contexto, faz-se necessário a realização de avaliação ecotoxicológica por meio de ensaio(s) com outro(s) animal(ais) não alvo(s) presente(s) no ecossistema aquático (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN 2000).

2.6 Testes Ecotoxicológicos

A ecotoxicologia aquática ou toxicologia ambiental apresenta-se como uma das especialidades da toxicologia, ela é uma ciência altamente eclética e multidisciplinar, que concentra os seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de um ecossistemas definido. Os estudos ecotoxicológicos tem por objetivo conhecer se uma ou mais substâncias químicas isolada ou complexada tem potencial de causar danos aos seres vivos ou qualquer organismos quando exposto(s) a(s) mesma(s). Esta especialidade apropria-se de metodologias e princípios bem estabelecidos onde buscam descobrir os danos acarretados pela exposição a(s) molécula(s) nociva(s) e conseqüentemente busca(m) mensura os processos fisiopatológicos ocasionados pelas alterações bioquímicas e fisiológicas nos organismos (COSTA et al., 2008; VERNONNEN; SOBANSKA; CESNAITIS, 2014).

Ao lado de sua biodiversidade enorme, invertebrados ocupam posições-chave no funcionamento do ecossistema. Além disso, sua alta aptidão para abordagens experimentais em laboratório e em campo, o conhecimento existente sobre a sua ecologia e agrupamentos em comunidades e crescente disponibilidade de dados genômica em diversas espécies são metas fundamentais a serem considerados na ecotoxicologia. De muitas décadas, ferramentas e conceitos foram desenvolvidos para avaliar o perigo químicos de substâncias orgânicas e inorgânicas para água doce e invertebrados marinhos em laboratório e para examinar a qualidade dos ecossistemas aquáticos (CHAUMOT et al., 2014).

Os danos causados pela(s) agente(s) físico(s) e/ou químico(s) na maioria das vezes envolvem várias espécies, esses danos podem ser mensurada(s) através de bioensaios toxicológicos, podendo ser de acordo com o tempo de exposição e em diferentes concentrações que estes organismos se encontraram expostos, assim podemos delinear as respostas agudas e crônicas do(s) organismo(s). Os testes ecotoxicológicos são necessários para se estabelecer os valores limites e de forma segura do(s) dos danos ocasionados pelo(s)

agente(s) no ambiente, desta forma a avaliação de risco ambiental pode ser analisada (CHAPMAN, 2002).

Os bioensaios de toxicidade aguda são definidos pela exposição do organismo em diferentes concentrações. O tempo estimado de exposição geralmente ocorre entre 24 a 96 h, sendo avaliado a(s) resposta(s) da(s) substância(s) química(s) exposta(s) no(s) mesmo(s). O principal efetivo da toxicidade aguda é mensurar e avaliar a concentração letal onde mata 50% dos organismos expostos (CL_{50}). Na maioria dos experimentos de toxicidade aguda busca-se avaliar a concentração mínima utilizada para determinar a letalidade total dos organismos (VALADARES, 2006).

No fim da década de 80, aproximadamente 80% dos experimentos tinham apenas a letalidade de todos os organismos expostos como único critério de avaliação. Invertebrados foram os organismos teste mais utilizados (utilizado em 74,8% dos artigos) seguido de peixe (23,9%). Entretanto muitos organismos respondem mais lentamente aos estímulos provocado(s) pela(s) substância(s) o que acarretava que muitos deles não morriam nas determinadas concentrações no intervalo de 96 horas, e por isso não se encaixava na definição de toxicidade aguda. Desta forma foi estabelecido através de ensaios de toxicidade crônica os efeitos menos perceptíveis que poderiam ter sido camuflados, passando despercebido pelos pesquisadores no teste de toxicidade aguda (MALTBY; CALOW 1989).

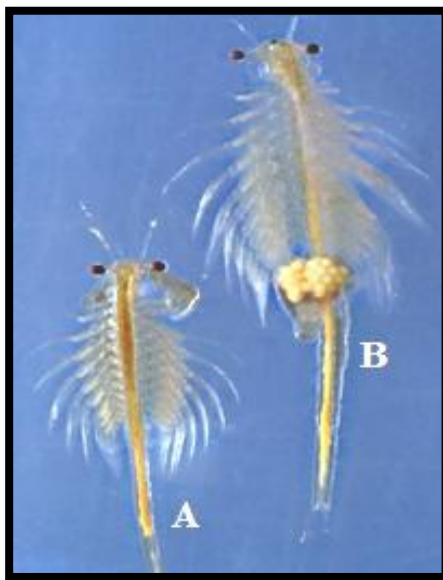
Os bioensaios de toxicidade crônica são caracterizados pela avaliação da(s) substância(s) química(s) resultantes de uma exposição prolongada com os organismos teste, a qual abrange uma parte ou um ciclo completo de vida do organismo. Estes organismos devem ser expostos em diversas concentrações e acompanhados para se obter um resultado fidedigno dos efeitos da(s) substância(s) química(s), sobre os parâmetros de sobrevivência, crescimento e reprodução. Uma das principais características da toxicidade crônica é que os animais estejam vivos posteriormente à exposição e que venham ser analisadas as suas funções fisiológicas, isto devido a desordem que ocorre na sua homeostase (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

2.6.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A *Artemia salina* Leach (Figura 15) é um invertebrado aquático primitivo com idade de cerca de 100 milhões de anos, com tamanho entre 8 a 10 mm de comprimento,

cientificamente encontra-se presente no reino Animalia, filo Arthropode, Subfilo Crustácea, classe Branchiopoda, subclasse Sarsotrachea, ordem Anostraca, família Artemiidae, gênero *Artemia* (ASEM; RASTEGAR-POUYANI; RÍOS-ESCALANTE, 2010; DUMITRASCU, 2011). O corpo da *A. salina* é composto por três segmentos: cabeça, tórax e abdômen. A espécie apresenta dimorfismo sexual, as principais diferenças morfológicas entre machos e fêmeas foram observados em distância máxima entre o diâmetro dos olhos compostos, o comprimento da primeira antena, a largura do terceiro segmento abdominal e o comprimento do abdômen. O macho adulto alcançar a 8-10 mm de comprimento, e a fêmea de 10-12 mm. Os machos têm dois órgãos de reprodução e o útero de uma fêmea de *A. salina* pode conter até 200 ovos (DUMITRASCU, 2011). Por si só, as características intrínsecas do gênero *Artemia* (ampla distribuição geográfica, cultura e manutenção em laboratório (simples), resistência à manipulação, curto ciclo de vida (com quatro estágios de desenvolvimento: náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto), adaptabilidade às fontes nutricionais e se reproduzem em abundância), transformá-lo em um organismo adequado para uso em ecotoxicologia, garantindo viabilidade confiabilidade e também mostra uma excelente relação custo-eficácia das práticas de ecotoxicidade de rotina e/ou de pesquisa (NUNES et al., 2006).

Figura 15: Casal de *Artemia salina* Leach (A) Macho e (B) Fêmea.



Fonte: DUMITRASCU (2011).

O bioensaio com *A. salina* literalmente tem sido utilizado em diversas áreas científicas, tais como fisiologia, ecotoxicologia, aquicultura, genética e até mesmo na avaliação da bioatividade de plantas medicinais utilizadas na medicina popular (VARÓ et al.,

2002; GRAMMOU et al., 2011; ARCANJO et al., 2012; D'ORS; BARTOLOMÉ; SÁNCHEZ-FORTÚN, 2013). Onde se busca avaliar biomoléculas com potenciais biotecnológicos de fontes naturais (PARRA et al., 2001; SANTOS et al., 2010; PROCÓPIO et al., 2015) ou sintéticos (LIMA et al., 2002; MARTINS et al., 2014) e que também possam apresentar propriedades moluscidas contra hospedeiros da esquistossomose mansônica (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN 2000; SANTOS et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014; ROCHA-FILHO et al., 2015).

Assim os bioensaios com *A. salina* pode mensurar os possíveis danos ambientais limitando ou orientando corretamente a aplicação dos moluscida nas áreas endêmicas onde encontra-se presente os hospedeiro intermediário do *S. mansoni* (GRAMMOU et al., 2011; MARTINS, 2013; ROCHA-FILHO et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial moluscicida do ácido úsnico e do usnato de potássio a *Biomphalaria glabrata*.

3.2 Objetivos Específicos

- Coleta do líquen *Cladonia substellata*;
- Obtenção, isolamento e purificação do ácido úsnico;
- Modificar quimicamente o ácido úsnico em usnato de potássio;
- Analisar quimicamente o grau de pureza do ácido úsnico e usnato de potássio através dos métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Infra Vermelho;
- Avaliar a toxicidade do ácido úsnico sobre caramujos adultos da *Biomphalaria glabrata*;
- Avaliar a toxicidade do ácido úsnico e o usnato de potássio sobre os embriões da *B. glabrata*, analisando os parâmetros embrionários inviabilidade (mortalidade e má-formação) e viabilidade (eclodidos/vivos) em diferentes estágios de desenvolvimento.
- Avaliar a toxicidade do ácido úsnico sobre o bioindicador ambiental *Artemia salina*.

4. ARTIGO 1

Potassium Usnate Toxicity Against Embryonic Stages of the Snail *Biomphalaria glabrata*

Abstract Aceito em Formato de Artigo para ser Publicado na BMC Proceedings

Qualis CBII B3

De: SBbiotec-6 (sbbiotec6@conference-service.com)

Enviada: quinta-feira, 5 de novembro de 2015 22:21:04

Para: dough_biomar@hotmail.com

Dear Mr Andrade de Araujo,

Your submitted abstract has been reviewed by one or more members of the scientific committee of the 6th Brazilian Congress of Biotechnology.

We are pleased to inform you that your abstract to SBBIOTEC-6, entitled

"Potassium Usnate Toxicity Against Embryonic Stages of the Snail *Biomphalaria glabrata*"

has been accepted by the committee for presentation at the Congress and publication into BMC Proceedings.

Please note that some of you who had submitted the abstract earlier have already received this same message before. This is just due to the way that the email communication system was setup.

Please access the conference management system at <https://www.conference-service.com/sbbiotech6/welcome.cgi> to check whether the scientific committee has required any minor revision of your abstract regarding the use of the English language, content, and/or format (text , references) according to BMC required rules.

Only after all required revisions (English, format and content) have been carefully completed, your abstract will be sent for final publication into BMC Proceedings. This will happen after the Congress.

Potassium Usnate Toxicity Against Embryonic Stages of the Snail *Biomphalaria glabrata*

Hallysson Douglas Andrade de Araujo¹, Hianna Arely Milca Fagundes Silva¹, Luanna Ribeiro dos Santos Silva², Williams Nascimento de Siqueira², Caíque Silveira Martins da Fonseca¹, Ana Paula Santa`Anna da Silva¹, Nicácio Henrique da Silva¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo², Mônica Cristina Barroso Matins¹, Vera Lúcia de Menezes Lima¹.

¹ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Department of Biophysic and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Background

Schistosomiasis affects millions of people at tropical and subtropical regions. In Brazil, thousands of new cases and hundreds of deaths annually are related to environmental problems and the presence of snails of the genus *Biomphalaria* [1]. *B. glabrata* is located over Brazilian coast and is the main vector of the disease [2]. *B. glabrata* elimination or control is an important alternative to reduce or eliminate schistosomiasis. The molluscicidal (niclosamide), recommended by the World Health Organization for this purpose, has high cost and it has demonstrated a high environmental toxicity [3]. For this reason, alternative molluscicides have been researched, such as the substances obtained from lichens. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of potassium usnate obtained from *Cladonia substellata* (lichen) over the embryonic stages of *B. glabrata*.

Keywords; *Cladonia substellata* Vanio, Molluscicidal, Schistosomiasis

Methods

Cleaned and dried stems from *C. substellata* (60 g) were subjected to four successive extractions with cold diethyl ether (150 ml) in order to isolate usnic acid. Further isolation and purification was done using a silica column eluted with chloroform/hexane (80:20 v/v). To obtain potassium usnate, 500 mg of usnic acid were partially dissolved in distilled water at 40 °C, 10% potassium hydroxide was added carefully until complete solubilization of the sample, and then the samples were lyophilized [4]. The structure of the molecule was confirmed by infrared and ¹H NMR. For biological assays, embryos (n = 100) in stages of blastula (E1), gastrula (E2), trocophore (E3) and veliger (E4) [5], were exposed during 24 h to the dissolved potassium usnate in filtered and dechlorinated water at concentrations ranging from 1 to 6 mg/ml. After the exposure period, the embryos were washed and transferred to clean plates with filtered and dechlorinated water where they were monitored for 7 days in

order to observe viability parameters: hatching, malformation, and death. The experiments were performed in triplicate [3].

Results and Conclusions

Potassium usnate concentrations of 3 and 5 µg/ml provoked 26% and 48% of non-viable embryos at stage E1, while lower concentrations (2 and 3 µg/ml) were needed to cause similar results in E2 embryos. E3 and E4 stage embryos were also strongly affected by potassium usnate, only 2.5 µg/ml were needed to cause 27% and 26% of malformation or death, respectively, with increased levels along the other concentrations. 100% mortality was observed in stages E1, E2, E3, and E4 on 6.0, 4.0, 4.5, and 4.5 µg/ml concentrations, respectively. By these experiments, it is possible to understand that potassium usnate is an efficient and promising molecule to be used in control and elimination of *B. glabrata* in the embryonic stages.

Acknowledgments

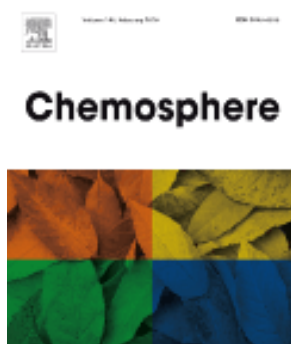
The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE).

References

- [1] Gryseels, B. Schistosomiasis. Infect Dis Clin N Am. 2012; doi:10.1016/j.idc.2012.03.004.
- [2] Scholte RGC, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. Geospat Health. 2012; doi:org/10.4081/gh.2012.127.
- [3] Rapado LN, Freitas GC, Polpo A, Rojas-Cardozo M, Rincón JV, Scotti MT, Kato MJ, Nakano E, Yamaguchi LF. A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. Molecules. 2014; doi:10.3390/molecules19045205.
- [4] Martins MCB, Silva MC, Silva LRS, Lima VLM, Pereira EC, Falcão EPS, Melo AMMA, Silva NH. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Plos One. 2014; doi:10.1371/journal.pone.0111102.
- [5] Camey T, Verdonk NH. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. Neth. J. Zool. 1969; doi: 10.1163/002829670X00097.

5. ARTIGO 2

Assessment of toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Biomphalaria glabrata* vector of *Schistosoma mansoni* in different embryonic stages, adult snails and *Artemia salina*



A ser Submetido para a Chemosphere

Fator de Impacto 3.340

Qualis CBII. B1

Assessment of toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Biomphalaria glabrata* vector of *Schistosoma mansoni* in different embryonic stages, adult snails and *Artemia salina*

Hallysson Douglas Andrade de Araújo¹, Hassan de Holanda Albuquerque¹, Luanna Ribeiro dos Santos Silva², Williams Nascimento de Siqueira², Caíque Silveira Martins da Fonseca¹, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira³, Nicácio Henrique da Silva¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo², Mônica Cristina Barroso Martins¹, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}.

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

³ Departamento de Ciências Geográficas; Universidade Federal de Pernambuco, 50740-530, Recife - PE - Brazil.

* Corresponding author: Tel: +55 (81) 2126-8540; Fax: (81) 2126.8541; email address: lima.vera.ufpe@gmail.com (Lima, V.L.M.).

Abstract: This study reports the molluscicidal effect of usnic acid isolated *Cladonia substellata* Vanio, lichen on embryos at different stages of development and in adult snails of *B. glabrata*. The toxicity of the usnic acid on *Artemia salina* larvae was also investigated to determine the safety of its use for vector control. The molecule was obtained from the ether extract, isolated and purified on silica gel column, and subsequently assessed by nuclear magnetic resonance of protons. After 24 hours of exposure, the usnic acid was activated for embryos at all stages of development causing unviable (malformations and deaths). The Treatment with usnic acid in stage blastula determined a LC₅₀ 1.38 µg/mL to the second embryo, gastrula achieve a LC₅₀ 3.47 µg/mL, the trochophore stage with the highest concentration to determining the LC₅₀ 5.11µg/ml and finally veliger LC₅₀ 2.93 µg/mL. For adult clams high activity was detected with the usnic acid, with a LC₅₀ 2.12 µg/mL after 24 h of exposure and LC₅₀ 1.58 µg/mL followed by 7 days, and the value displayed in this last concentration non-toxic to the environmental toxicity tests on *Artemia salina* LC₅₀ 2.46 µg/mL. In conclusion, These findings demonstrate teratogenic and molluscicide potential of the usnic acid in the control of *B. glabrata*.

Keywords: Molluscicidal Activity, *Biomphalaria glabrata*, Neglected Diseases, Embriotoxicity, Natural Product.

1. Introduction

Schistosomiasis is present in African, American, Asian, and Eastern Mediterranean continents. Estimates show that at least 258 million people required preventive treatment for schistosomiasis in 2014 in 78 countries. Approximately 200 thousands deaths occur annually associated with the infections by the worms of the genus *Schistosoma*. Their environmental control has been proven challenging, because due to the difficulties related to sanitation, behavior changes and snail control would also reduce transmission (World Health Organization, 2016).

Biomphalaria glabrata is the main vector of *S. mansoni*, as it releases thousands of cercariae, infective stage of the parasite, into the aquatic environment daily. The mollusk can be located in a coastal strip covering the Northeast, Southeast and Northern parts of the North and South regions of Brazil (Scholte et al., 2012). As a method to reduce the populations of the vectors, the World Health Organization recommends the use of synthetic molluscicide Niclosamide (Bayluscide, Bayer) (World Health Organization, 1965). However, the use of this product has generated increasing concerns as a result of the development of resistance of the snails, low selectivity and the high cost to poor or emerging countries (Oliveira-Filho et al, 2010; King and Bertsch, 2015).

Thus, the search for a molluscicide from a natural source gained a new prominence, in order to obtain an alternative product with low cost, biodegradable, safe and available locally to control the population of snails (Rapado et al., 2013). Others have reported that the molluscicidal activity of natural origin is related to the presence of polyphenols and their interactions with molecules, including proteins and polysaccharides (Haslam, 1996). These polyphenols are structures commonly found in organisms such as lichens, symbiotic beings found in tropical and subtropical regions (Ahti, 2000).

The lichens present in their structure fungi (mycobiont, heterotrophic) and green algae or cyanobacteria (photobiont, autotrophic), producing secondary metabolites. Currently, over 850 polyphenol compounds have been quantified, with more than 80% of them unique to the mononuclear, aromatic, depsides, depsidones, diphenyl ether, and dibenzofuran classes (Yousuf et al., 2014). Lichens of the *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, and *Evernia* genus have a major secondary metabolite, usnic acid (UA) [2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-1,3-dimethyl-8-9b (2H,9 α / β H) - dibenzofurans) (Fig. 1). This metabolite plays an

important biological role, giving the lichens protection against invading microorganisms, UV rays, and stem dryness (Ingólfssdóttir, 2002). This molecule is very promising for presenting several biological properties, such as healing (Bruno et al., 2013), antiviral (Shtro et al., 2014), anti-inflammatory, antioxidant (Su et al., 2014), antimicrobial (Taresco et al., 2015) and anti-parasitic (Luz et al., 2015).

Although natural molluscicides are biodegradable, extracts or isolated molecules may prove risk, even at concentrations that are recommended by the World Health Organization (World Health Organization, 1965). In this context, it is necessary to ecotoxicological assessment through test with bio-indicator for substances that have molluscicidal property (Calleja and Persoone, 1993; Nunes et al., 2006). The *Artemia salina* is extremely sensitive to toxic agents and can measure the possible environmental damage, limiting or properly guiding the application of molluscicides in the endemic areas (Grammou et al., 2011; Rocha-Filho et al., 2015).

Therefore, this study aimed to investigate the effect of usnic acid, isolated from *C. substellata* Vainio on molluscs of *B. glabrata* in adulthood and in different embryonic stages and its ecotoxicological assessment with *A. salina*.

2. Materials and methods

2.1. Samples *Cladonia substellata*

Cladonia substellata Vainio samples were collected in the city of Mamanguape, Paraíba Brazil (6°42'1.5" S/25°8'3.3"W) in February 2015. The specimen was deposited in the UFP herbarium Geraldo Mariz. Dept. of Botany of the Federal University of Pernambuco, Recife/PE, Brazil voucher nº 77. 474.

2.2. Organic Extract

C. substellata samples (120g) were cleaned, dried, grind and subjected to successive extractions with diethyl ether (150 mL) until exhaustion of the stem (7x), at room temperature. For each extraction, organic extract was placed in 4 °C for 24 hours and then filtered. Then, the extracts were submitted to evaporation in a Soxhlet apparatus at 40°C to dryness (Asahina and Shibata, 1954).

2.3. Usnic Acid

The usnic acid isolation and purification was performed according to Odabasoglu et al. (2006). 243 mg of the ether extract was fractionated on a silica gel column (0.05 to 0.20 mm - Merck), eluted in the solvent system chloroform-hexane (80:20 v/v) and subsequently evaporated. The obtained fractions were monitored by thin layer chromatography (TLC). This procedure was repeated until the obtainment of high purity usnic acid (>95%). The confirmation of the molecular structure was performed by analyzing the spectra of proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) obtained at 300 MHz in CDCl_3 (Varian UNITY spectrometer) and infrared spectroscopy.

2.4. Bioassays

2.4.1. *Biomphalaria glabrata* obtention

Biomphalaria glabrata pigmented adults were collected in Sao Lourenço da Mata (Pernambuco - Brazil) and maintained by successive generations in moluscario of Radiobiology Laboratory at the Department of Biophysics and Radiobiology of the Federal University of Pernambuco Federal University of Pernambuco, Recife / PE, Brazil. The snails were maintained in plastic tanks of 20 liters of filtered and dechlorinated water, pH 7.0 and temperature $25 \pm 3^\circ \text{C}$ and fed daily with organic *Lactuca sativa*.

2.4.2. *B. glabrata* embryotoxicity assay

The embryotoxicity assay was performed according to the methodology described by Rapado et al. (2013). To collect egg masses colorless, polyethylene strips (10x10cm) were placed on the surface of the aquarium water. The egg masses deposited in polyethylene strips were separated with the help of a stereoscopic microscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland) and analyzed according to Kawano et al. (1992) on their viability and embryo stage, which were identified after the first cleavage of the egg blastula, gastrula, trocophore and veliger (Fig. 2).

For embryotoxicity tests, groups of 100 embryos were selected and deposited in petri dishes with 10 ml of usnic acid solutions dissolved in 0.5% DMSO in concentrations ranging from 1.0 to 6.0 $\mu\text{g/mL}$ for the stages of blastula, gastrula, trocophore and veliger. They used two negative controls: dechlorinated filtrated water (Control 1) and filtered water dechlorinated containing 0.5% DMSO (Control 2); and a positive control with niclosamide (NCL) at 1.0 $\mu\text{g/mL}$. All groups were exposed for 24 h, then embryos were washed with

filtered dechlorinated water and placed in clean plates with filtered dechlorinated water and analyzed for 7 days in order to check their positive (hatch) or negative (death or malformation) viability. Two independent experiments were performed in triplicate.

2.4.3. *B. glabrata* adult toxicity assay

B. glabrata toxicity assay was performed according to the WHO (1965) recommended method. Pigmented *B. glabrata* young adults with shell diameter between 10 and 14 mm were placed in individual containers (180 mL dechlorinated filtered water) and observed for seven consecutive days to check sexual maturity. Eight groups of 10 individuals each were used as follows: Negative Controls - dechlorinated filtered water (control 1) and dechlorinated filtered water plus 0.5% DMSO (control 2); Positive Control (NCL 1.0 µg/mL) and test usnic acid (1.0, 2.0, 2.5, 3.0 and 4.0 µg/mL) for 24 h. After exposure, the living snails were transferred to vessels containing 1.000 ml of filtered and dechlorinated water, fed and monitored daily for 7 days. The mortality criteria was the cephalopodal mass retraction into the shell, loss of hemolymph, discoloration of shell color and absence of beats in the pericardial cavity. Two independent experiments were performed in triplicate.

2.4.4. Environmental toxicity test in *Artemia salina*

Artemia salina encysted eggs were placed in a beaker (500 ml) with seawater (pH 8.0) with constant aeration and at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) for 48 h. After hatching, the larvae were separated with the assistance of a stereomicroscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland) in experimental groups ($n = 10$): Negative Controls (sea water; sea water plus 5% DMSO) and usnic acid at different concentrations (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4 µg/mL) for 24h at room temperature according to the procedure described by Meyer et al. (1982). Two independent experiments were performed in quadruplicate for each concentration and assessment of mortality and survival of larvae was carried out by observation of motility with the assistance of stereomicroscope.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, USA). Differences among groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keulspost test. P values lower than 0.05 were considered significant. The lethal concentrations needed to kill 10% (LC_{10}), 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) of *B.*

glabrata (embryos and adults) and *Artemia salina* were calculated using the StatPlus® 2009 (AnalystSoft, Canada).

3. Results and discussion

3.1. Analysis of the molecular structure of usnic acid by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR).

Confirmation of molecular structure of the usnic acid was performed by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) (Fig. 1). The results show that purification was successfully obtained, similar data were found by Martins et al. (2014).

3.2. Usnic acid toxicity on embryos at different stages of development of *Biomphalaria glabrata*.

The results of embryonic unviability of usnic acid on *B. glabrata* at different development stages of *Biomphalaria glabrata* are described in Table 1. The blastula stage was the most sensitive to usnic acid, as it causes 100% unviability at a concentration of 2.0 $\mu\text{g/mL}$. The gastrula stage, otherwise, presented 100% unviability only at a concentration of 4.5 $\mu\text{g/mL}$. However, the stages of trochophore and veliger, it presents the same unviability with usnic acid at 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3). It is important to note that in concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ usnic acid caused 29% ($p < 0,0001$) for trochophore stage and 94% ($p < 0,0001$) for veliger. It was observed that the trochophore stage was less sensitive than veliger stage. According Kawano et al. (1992), the trochophore stage is characterized by having a double cell layer, the whole covered with cilia, unlike other embryonic stages. This feature may have hindered the absorption of usnic acid and therefore a low embryotoxicity at this stage.

No data was found in the literature on usnic acid action in different embryonic stages of *B. glabrata*, but experiments with pirplatina *Piper tuberculatum* (pepper) have shown that pirplatina caused 100% mortality to blastula, gastrula, trochophore and veliger stages at the concentrations of 1.2; 2.2; 3.6; and 5.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Rapado et al., 2013). In Table 2, we can observe the concentrations that causes 10, 50 and 90% mortality of the embryos at different embryonic and adult stage of *B. glabrata* snails exposed to the usnic acid for 24 h. The usnic acid has been active for all embryonic stages, as it caused a LC_{90} in the blastula stage of only 1.62 $\mu\text{g/mL}$, while the concentrations for LC_{50} in the stages of gastrula, trochophore and veliger were 3.47, 5.11 and 2.93 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

On the other hand, the isolated molecule of hydroquinone showed 100% mortality at the concentrations of 2.0, 4.0, 8.0, and 8.0 µg/ml for the same embryonic stages (Rapado et al. 2014). Other experiments were performed by Rapado et al. (2014) with the molecule isolated from *P. cumanense* (2',4',6'trihydroxydihydrochalcone), which noted that the concentration needed was 14.12, 13.54, 14.44, and 14.87 µg/mL to achieve 90% mortality of the embryos in the blastula, gastrula, trocophore, and veliger stages, respectively.

Embryotoxicity studies relating to the *B. glabrata* become important as they allow the observation of the unviability parameters (death and malformation) of the embryos caused by different chemicals. These snails can be exposed experimentally or in their natural habitat, especially when the goal is population control in schistosomiasis endemic areas (Yadav and Jagannadham, 2008; Oliveira-Filho et al., 2010; Kristoff et al., 2011).

3.3. Molluscicidal activity of adult *Biomphalaria glabrata*.

No data was found in the literature on the molluscicidal activity on adults of the usnic acid, but these results prove the molluscicidal potential of this substance. The results of the molluscicidal activity are shown in Figure 4, where it can be observed that 3 and 4 µg/mL usnic acid caused 87% (C p < 0,0001) and 100% (C p < 0,0001) mortality to adult *B. glabrata* at the first 24 hours. It can also be observed usnic acid toxicity after 7 days in the concentrations of 1.0, 2.0, 2.5 and 3.0 µg/mL, which caused 26.7% (B p < 0,001), 60% (p < 0,0001), 90% (p < 0,0001), and 100% (p < 0,0001) death of the adults mollusks exposed, respectively.

The LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ to adult snails, exposed 24h to usnic acid and monitored at the end of 7 days, are described in Table 2. After the 7th day of observation, usnic acid showed LC₅₀= 1.58 µg/mL and LC₉₀= 2.56 µg/mL.

The World Health Organization (1983) published methodological specifications classifying natural substances as inactive when the percentage of mortality of mollusks represents from 0 to 30%; partially active when they cause mortality 40 to 60% and active when 70 to 100% of them are eliminated after 24h exposition. However, according to this publication, substances of vegetable origin will be considered active when it gets 90% mortality at concentrations of 20 µg/mL for single molecules and 100 µg/ml for crude vegetables. It was shown that the usnic acid had high molluscicidal action against *B. glabrata*, one being used approximately 7 times lower than the concentration recommended by the

World Health Organization (1983). Therefore, in this context, the usnic acid fits World Health Organization specifications and demonstrated to be a promising molluscicide of natural origin. It was reported that molluscicidal activity of the potassium salt derived from usnic acid obtained 100% mortality to *B. glabrata* at a concentration of 1 µg/mL, thereby there is usnic acid molecule modification in salt form that may facilitate its spread in intracellular medium, increasing their molluscicide action (Martins et al., 2014).

The research of molluscicide substances that act upon egg masses as for adults are as important as analyzing their mechanism of action. Some authors suggest that the performance of the usnic acid on embryos occurs because of its heterocyclic structure, formed by of conjugated dienes and polar OH groups (lipophilic molecule), which readily diffuses through cell membranes (Ingólfssdóttir, 2002; Joseph et al, 2009). Another possible mechanism of usnic acid action is the influence on the inner mitochondrial membrane polarity, which causes a electron transport chain decoupling and provokes proton leakage. Therefore triggering important biochemical and physiological changes in cell homeostasis, which can lead to cell apoptosis (Joseph et al., 2009).

The screening results on molluscicide action of different isolated lectins from Brazilian Northeast vegetables upon *B. glabrata* showed that *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Dioclea guianensis* (DGL) have no molluscicidal activity while *Cratylia floribunda* (CFL) and *D. virgata* (Dvir) caused 20% and *D. grandiflora* (Dgui) 40% mortality at concentrations of 20 µg/ml, respectively (Santos et al., 2010). However lectin *Microgramma vacciniifolia* showed 25% mortality on *B. glabrata* in concentration 100 µg/ml (Albuquerque et al., 2014). Rapado et al. (2014) conducted molluscicide tests with *B. glabrata* snails using molecules isolated from *P. diospyrijolium* (flavokawain A), *P. gaudichaudianum* (2',4',6'trihydroxydihydrochalcone) and hydroquinone. In these cases, 90% mortality was obtained at concentrations of 27.97, 6.47 and 5.27 µg/mL, respectively.

3.4 Environmental toxicity of usnic acid

The toxic effect of 24-hour usnic acid exposition on *Artemia salina* can be seen in Figure 5.

In summary, usnic acid treatment showed no toxic effect, compared to Control 2 group, at the concentration of 2 µg/mL, which has been shown to be enough to cause 50% of deaths on adult *B. glabrata* $LC_{50} = 1.58 \mu\text{g/mL}$. However, concentrations above 2.5 µg/mL

observed a significant increase in toxicity for *A. salina*, that showed $LC_{50} = 2.46 \mu\text{g/mL}$. According to our results, it is evident that the use of the usnic acid for the control of schistosomiasis requires special attention; it was observed that $3 \mu\text{g/mL}$ causes 100% ($C p < 0,0001$) molluscicide action but this concentration caused 77% ($C p < 0,0001$) mortality for *A. salina*.

In addition, when compared NCL and usnic acid action, it is noted that the first substance caused 100% mortality to *A. saline* at a concentration of $1 \mu\text{g/mL}$. Thus, the possible use of the usnic acid as molluscicide must be focused and controlled in order to assess the effect of this substance on other non-target organisms in aquatic environment (Oliveira-Filho et al., 2004; D'ors et al, 2013).

4. Conclusion

The isolated molecule of usnic acid showed molluscicidal activity in all embryonic stages and during the adult stage, causing mortality in both embryonic and adult *B. glabrata*. Environmental toxicity of usnic acid was smaller than the molluscicide adopted by the World Health Organization.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE).

References

- Ahti, T, 2000. Cladoniaceae. The Organization for Flora Neotropica. New York Botanical Garden Press 78, 1-362.
- Albuquerque, L.P., Pontual, E.V., Santana, G.M.S., Silva, L.R.S., Aguiar, J.S., Coelho, L.C. B.B., Rêgo, M.J.B.M., Pitta, M.G.R., Silva, T.G., Melo, A.M.M.A., Napoleão, T.H., Paiva, P. M. G., 2014. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. Acta Tropica. v. 138, p. 23-27. doi: org/10.1016/j.actatropica.2014.06.005.
- Asahina, Y., Shibata, S., 1954. Aromatic Lichen Substances. In Chemistry of lichen substances. ed. Japan Society for the Promotion of Science. Tokyo, p. 130-150.

Bruno, M., Trucchi, B., Burlando, B., Ranzato, E., Martinotti, S., Akkol, E.K., Suntar, I., Keles, H., Verotta, L., 2013. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1834-1843. doi: org/10.1016/j.bmc.2013.01.045.

Calleja, M.C., Persoone, G., 1993. The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates. *Chemosphere* 26, 2007-2022. doi: 10.1016/0045-6535(93)90027-3.

D'ors, A., Bartolome, M.C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and estuarine ecosystems and its impact on *Artemiafranciscananauplii* populations. *Chemosphere* 90, 2187-2192. doi: org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.029.

Grammou, A., Papadimitriou, C., Samaras, P., Vasara, E., Papadopoulos, A.I., 2011. Effect of municipal waste water effluent upon the expression of Glutathione S-transferase isoenzymes of brine shrimp *Artemia*. *Chemosphere* 84, 105-109. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.047.

Haslam, E., 1996. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.* 59, 205-215. doi: 10.1021/np960040+.

Ingólfssdóttir K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 729-736. doi:10.1016/S0031-9422(02)00383-7.

Joseph, A., Lee, T., Moland, C.L., Branham, W.S., Fuscoe, J.C., Leakey, J.E.A., Allaben, W.T., Lewis, S.M., Ali, A.A., Desai, V.G., 2009. Effect of (+)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F₁ mice. *Mitochondrion* 9, 149-158. doi:10.1016/j.mito.2009.02.002.

Kawano, T., Okazaki, K., Ré, L., 1992. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia* 34, 25-32.

King, C.H., Bertsch, D., 2015. Historical Perspective: Snail Control to Prevent Schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 4. doi:10.1371/journal.pntd.0003657.

Kristoff, G., Cacciatore, L.C., Guerrero, N.R.V, Cochón, A.C., 2011. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere* 84, 585-591. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.058.

Luz, J.S.B., Oliveira, E.B., Martins, M.C.B., Silva, N.H., Alves, L.C., Santos, F.A.B., Silva, L.L.S., Silva, E.C., Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. *Scientific World Journal* 25, 1-7. doi: org/10.1155/2015/617401.

Martins, M.B.C., Silva, M.C., Silva, L.R.S., Lima, V.L.M., Pereira, E.C., Falção, E.P.S., Melo, A.M.M.A., Silva, N.H., 2014. Usnic acid Potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PlosOne*. 9, doi:10.1371/journal.pone.0111102.

- Meyer, B.N., Ferrigini, N.R., Putman, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31-34. doi: 10.1055/s-2007-971236.
- Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M., Van Stappen, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ. Poll.* 144, 453-462. doi:10.1016/j.envpol.2005.12.037.
- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* 103, 59-65. doi: 10.1016/j.jep.2005.06.043.
- Oliveira-Filho, E.C., Lopes, R.M., Paumgarten, F.J.R., 2004. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere* 56, 369-374. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.04.026.
- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgarten, F.J.R., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81, 218-227. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.038.
- Rapado, L.N., Pinheiro, A.S., Lopes, P.O.M.V., Fokoue, H.H., Scotti, M.T., Marques, J.V., Ohlweiler, F.P., Borrelly, S.I., Pereira, C.A.B., Kato, M.J., Nakano, E., Yamaguchi, L.F., 2013. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, doi: 10.1371/journal.pntd.0002251.
- Rapado, L.N., Freitas, C.G., Polpo, A., Rojas-Cardozo, M., Rincón, J.V., Scotti, M.T., Kato, M.J., Nakano, E., Yamaguchi, L.F., 2014. A benzoic acid derivative and flavokawains from piper species as schistosomiasis vector controls. *Molecules* 19, 5205-5218. doi: 10.3390/molecules19045205.
- 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., 2015. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere* 132, 188-192. doi: org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.041.
- Santos, A.F., Cavada, B.S., Rocha B.A.M., Nascimento, K.S., Sant'ana, A.E.G., 2010. Toxicity of some glucose/manose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour. Technol.* 101, 794-798. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.062.
- Scholte, R.G.C., Carvalho, O.S., Malone, J.B., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2012. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. *Geospat Health.* 6, 95-101.
- Shtro, A.A., Zarubaev, V.V., Luzina, O.A., Sokolov, D.N., Kiselev, O.I., Salakhutdinov, N.F., 2014. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 6826-6836. doi: org/10.1016/j.bmc.2014.10.033.

Su, Z., Mo, Z., Liao, J., Feng, X., Liang, Y., Zhang, X., Liu, Y., Chen, X., Chen, Z., Su, Z., Lai, X., 2014. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.* 22, 371-378. doi: org/10.1016/j.intimp.2014.06.043.

Taresco, V., Francolini, I., Padella, F., Bellusci, M., Boni, A., Innocenti, C., Martinelli, A., D'Ilario, L., Piozzi, A., 2015. Design and characterization of antimicrobial usnic acid loaded-core / shell magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 52, 72-81. doi: org/10.1016/j.msec.2015.03.044.

World Health Organization, 1965. Molluscicide screening and evaluation. *Bull World Health Organ* 33, 567-581.

World Health Organization, 1983. Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide& Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva: TDR/SC 4-SWE 4, 83.3.

World Health Organization, 2016. Schistosomiasis. Fact sheet number 115.

Yadav, S.C., Jagannadham, M.V., 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere* 71, 1295-1300. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.068.

Yousuf, S., Choudhary, M.I., Atta-ur-Rahman., 2014. Lichens: Chemistry and biological activities. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 43, 223–259. doi: org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00007-2.

FIGURE

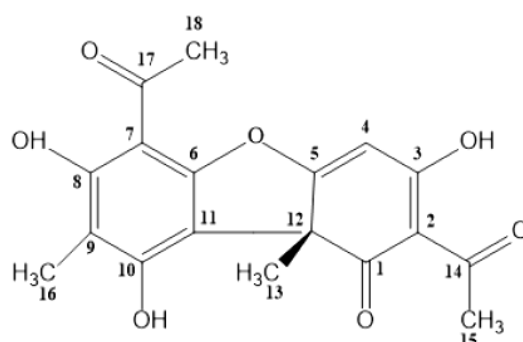


Fig. 1. Usnic Acid Chemical Structure.

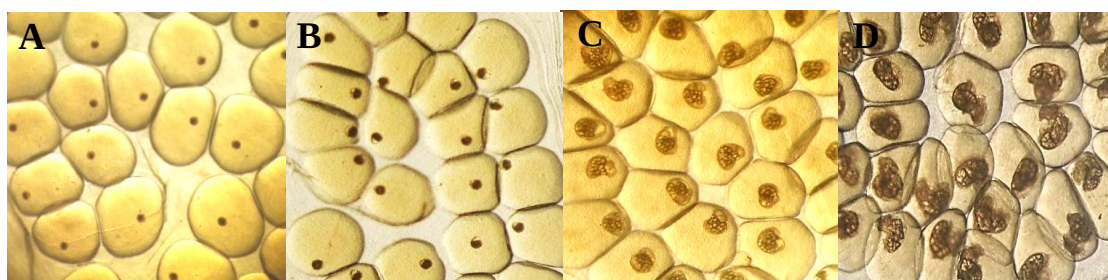
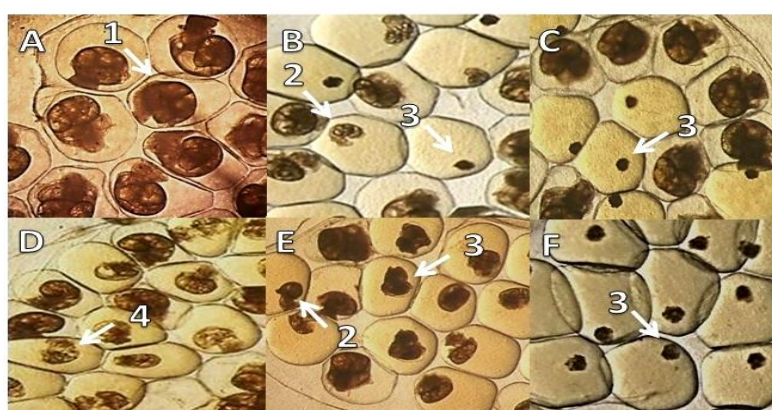
Fig 2. A: *Biomphalaria glabrata* different embryonic stages. A: blastula; B: gastrula; C: trocophore; D: veliger.

Fig. 3. *Biomphalaria glabrata* embryos exposed to different concentrations of usnic acid. **A** (1) – Normal Embryo (control filtered and dechlorinated water). **B** Blastula stage (2) Developmental delay. (3) Embryo dead (concentration 1.5 $\mu\text{g/mL}$). **C** Gastrula stage (3) Embryo dead (concentration de 3 $\mu\text{g/mL}$). **D** Trocophore stage (4) Shell malformation (concentration 5.5 $\mu\text{g/mL}$). **E** Veliger stage (2) Developmental delay (3) Embryo dead (Concentration 4 $\mu\text{g/mL}$). **F** (3) Embryo dead (positive control – NCL 1 $\mu\text{g/mL}$). (A, B, C, D, E e F magnification 40x).

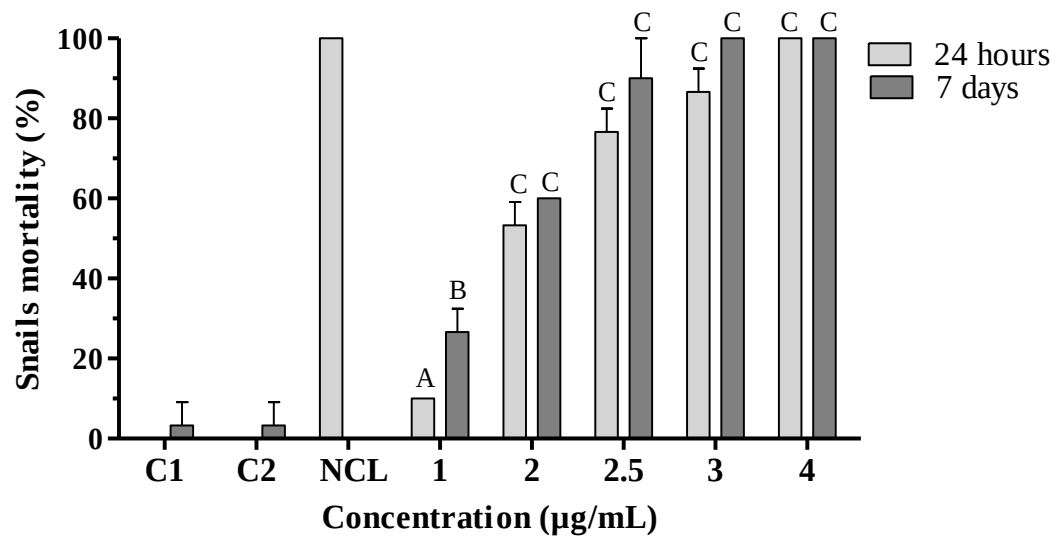


Fig. 4. Usnic acid mortality on adult snails of *B. glabrata*. Control 1 (C1): filtered and dechlorinated water. Control 2 (C2): filtered and dechlorinated water plus 0.5% DMSO. NCL: niclosamide 1 µg/mL. Dose-response effect of usnic acid concentrations in µg/mL. Significant results were compared with C2. In 24 hours (A $p < 0,05$) and (C $p < 0,0001$). In 7 days, (B $p < 0,001$) and (C $p < 0,0001$).

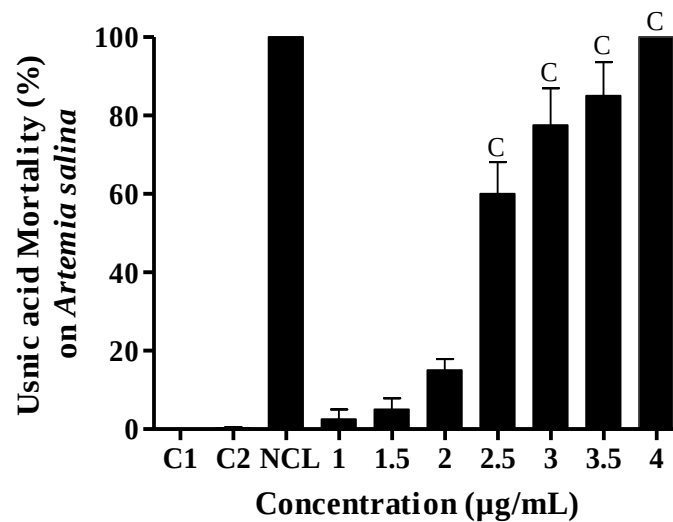


Fig. 5. Usnic acid toxicity on *Artemia salina*. Control. 1 (C1): filtered water; Control 2 (C2): filtered water plus 0.5% DMSO; NCL: 1µg/mL niclosamide. Significant results were compared with C2. In 24 hours (C = $p < 0.0001$ vs C2).

TABLE

Table 1.

Biomphalaria glabrata embryos unviability treated with usnic acid at different embryony stages.

Treatments	Unviable in Stage Embryonic (%)			
	Blastula	Gastrula	Trocophore	Veliger
Control 1	1.33±0.57	0.33±0.57	1.0±1.0	1.0±1.0
Control 2	2.66±0.57	0.66±1.15	1.66±1.52	2.33±2.30
Niclosamide 1.0	100	100	100	100
Usnic acid (µg/mL)				
1	1.66±1.15	2.66±3.78	4.66±2.51	10.0±4.0
1.5	51.0 ^c ±6.0	11.0±3.46	6.33±2.51	14.67±9.29
2	100 ^c	22.67 ^b ±9.23	8.0±4.35	25.0 ^b ±7.93
2.5	-	32.0 ^c ±7.0	7.33±2.51	34.33 ^c ±2.88
3	-	36.33 ^c ±16.07	14.0 ^a ±6.55	49.33 ^c ±17.21
3.5	-	50.0 ^c ±8.18	15.67 ^b ±5.50	72.0 ^c ±3.60
4	-	72.67 ^c ±3.51	16.67 ^b ±1.15	89.33 ^c ±6.65
4.5	-	100 ^c	24.67 ^c ±2.30	93.67 ^c ±5.68
5	-	-	29.0 ^c ±1.0	93.67 ^c ±4.93
5.5	-	-	94.33 ^c ±3.78	97.0 ^c ±5.19
6	-	-	100 ^c	100 ^c

Values expressed as mean (± standard deviation) four to five eggs mass. Control 1: filtered and dechlorinated water; Control 2: filtered and dechlorinated water plus 0.5% DMSO; NCL: 1% niclosamide. Usnic acid concentrations in µg/mL. ^a P<0.05; ^b P<0.001; and ^c P<0.0001 versus Control 2.

Table 2.

Lethal concentration to all embryonic stages and adult snails of *Biomphalaria glabrata* exposed to usnic acid.

Embryonic stages and adult snails	Lethal Concentration (µg/mL)		
	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Blastula	1.13	1.38	1.62
Gastrula	1.35	3.47	nc*
Trocophore	2.54	5.11	nc*
Veliger	1.36	2.93	4.49
Adult snail – 24 h**	0.80	2.12	3.45
Adult snail – 7 days***	0.61	1.58	2.56

* nc- non calculated, value above the one evaluated experimentally.

** adult snail exposed for 24 hours to usnic acid.

*** adult snails observed for 7 days after 24 hours of exposure to usnic acid.

7. CONCLUSÕES

- O ácido úsnico e o usnato de potássio apresentaram toxicidade sobre todos os estágios embrionários da *Biomphalaria glabrata*.
- Com exceção do estágio de blástula o usnato de potássio apresentou uma maior embriotoxicidade nos demais estágios embrionários que o ácido úsnico.
- O ácido úsnico e usnato de potássio ocasionaram aos embriões em diferentes estágios embrionários malformações de conchas, embriões hidrópicos e malformações inespecíficas.
- Para moluscos adulto o ácido úsnico apresentou 53 e 87% de mortalidade nas concentrações de 2 e 3 µg/mL em 24 h de exposição e 90 e 100% nas concentrações de 2,5 e 3 µg/mL observados em 7 dias.
- O ácido úsnico na concentração de 2 µg/mL não apresentou toxicidade sobre o bioindicador ambiental *Artemia salina*.
- A molécula isolada do ácido úsnico e do usnato de potássio se mostraram substancias promissoras na eliminação ou controle populacional da *B. glabrata*.
- As concentrações utilizadas como agente embriotóxico e moluscicida foram menores que as preconizadas pela organização mundial da saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHTI, T.; STENROOS, S.; FILHO, L. V.. The lichen family *Cladoniaceae* in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Bryology**. v. 7, p. 55-70, 1993.

AHTI, T.. The Organization for Flora Neotropica. **New York Botanical Garden Press**. v. 78, p. 1-362. 2000.

AL-ZAMBAGI, N. A.. Review of Using Plants as Molluscicidal, Larvicidal and Schistosomicidal in Saudi Arabia. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 7, n. 7, p. 110-120, 2013.

ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. v. 138, p. 23-27, 2014.

ALVES, G. M. B.; MAIA, M. B. S.; FRANCO, E. S.; GALVÃO, A. M.; SILVA, T. G.; GOMES, R. M.; MARTINS, M. B.; FALCÃO, E. P. S.; CASTRO, C. M. M. B.; SILVA, N. H.. Expectoant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 27, p. 139-143, 2014.

ANASTASIOU, E.; LORENTZ, K. O.; STEIN, G. J.; MITCHELL, P. D.. Prehistoric schistosomiasis parasite found in the Middle East. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 14, Issue 7, p. 553-554, 2014.

ARAÚJO, K. C. G. M.; RESENDES, A. P. C.; SOUZA-SANTOS, R.; JÚNIOR, J. C. S.; BARBOSA, C. S.. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 409-417, 2007.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R. B.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia*

salina Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**. v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S.. Aromatic Lichen Substances. In Chemistry of lichen substances. **ed. Japan Society for the Promotion of Science**. Tokyo, p. 130-150, 1954.

ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N.; RÍOS-ESCALANTE, P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. **Latin American Journal of Aquatic Research**. v. 38, n. 3, p. 501-506, 2010.

ATTWOOD, S. W.; HUO, G.; QIU, J.. Update on the distribution and phylogenetics of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) populations in Guangdong Province, China. **Acta Tropica**. v. 141, p. 258-270, 2015.

BARBOSA, V. S.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; LOYO, R. M.; MARCELINO, S.; BARBOSA, C. S.. First report of schistosomiasis on Serrambi beach, Ipojuca, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 48, n. 6, p. 780-782, 2015.

BARBOSA, C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, E. S.; ARAÚJO, K.; ALBUQUERQUE, J.; MELO, F.; SEVILHA, M. A.; BRASILEIRO, D.; BARRETO, M. I.; LEAL-NETO, O. B.; BARBOSA, V.; CORREIA, W.; GUIMARÃES, R. J. P. S.. Epidemiologia da esquistossomose no Litoral de Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical**. v. 43, n. 4, p. 436-445, 2014a.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, V. S.; NASCIMENTO, W. C.; PIERI, O.; ARAUJO, K. C. G. M.. Study of the snail intermediate hosts for *Schistosoma mansoni* on Itamaracá island in northeast Brazil: spatial displacement of *Biomphalaria glabrata* by *Biomphalaria straminea*. **Geospatial Health**. v. 8, n. 2, p. 345-351, 2014b.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, V. S.; MELO, F. L.; MELO, M. S. B.; BEZERRA, L.; CAMPOS, J. V.; RODRIGUES, B. X.; NASCIMENTO, W. C.; GOMES, E. S.; LEAL-NETO, O.; DOMINGUES, A. L.. Casos autoctones de esquistossomose mansonica em crianças de Recife, PE. **Revista de Saúde Pública**. v. 47, n. 4, p. 684-690, 2013.

BARBOSA, V. S.; ARAUJO, K. C.; LEAL-NETO, O. B.; BARBOSA, C. S.. Spatial distribution of schistosomiasis and geohelminthiasis cases in the rural areas of Pernambuco,

Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 5. p. 633-638, 2012.

BARBOSA, C. S.; LEAL-NETO, O. B.; GOMES, E. C.; ARAÚJO, K. C.; DOMINGUES, A. L.. The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 106, n. 7, p. 878-883, 2011.

BARBOSA, C. S.; ARAUJO, K. C.; SEVILHA, M. A.; MELO F.; GOMES, E. C. S.; SOUZA-SANTOS, R.. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 4, p. 549-554, 2010.

BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S. M. L.; GUIDA, U. CARNEIRO, J.; TABOSA, B.; MORAES, C. N. L.; SPINELLI, V.. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 17, n. 3, p. 725-728, 2001.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; FREDERICO S, B.. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Revista Saúde Pública**. v. 34, n. 4, p. 337-341. 2000.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, F. S.. Controle. In: BARBOSA, F. Tópicos em Malacologia Médica. **Editora FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, p. 219-238, 1995.

BARBOZA, D. M.; ZHANG, C.; SANTOS, N. C.; SILVA, M. M. B. L.; ROLLEMBERG, C. V. V.; AMORIM, F. J. R.; UETA, M. T.; MELO, C. M.; ALMEIDA, J. A. P.; JERALDO, V. L. S.; JESUS, A. R. *Biomphalaria* species distribution and its effect on human *Schistosoma mansoni* infection in an irrigated area used for rice cultivation in northeast Brazil. **Geospatial Health**. v. 6, n. 3, p.103-109, 2012.

BARRETO, A. V. M. S.; MELO, N. D.; VENTURA, J. V. T.; SANTIAGO, R. T.; SILVA, M. B. S.. Analysis of *Schistosomiasis mansoni* positivity in endemic Health Regions in the State of Pernambuco, Brazil, 2005-2010. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**. v. 24, n. 1, p. 87-96, 2015.

BATES, S. T.; CROPSEY, G. W. G.; CAPORASO, J. G.; RKNIGHT, R.; FIERER, N.. Bacterial communities associated with the Lichen symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 4, p. 1309-1314, 2011.

BELLIO, P.; SEGATORE, B.; MANCINI, A.; PIETRO, L. D.; BOTTONI, C.; SABATINI, A.; BRISDELLI, B.; PIOVANO, M.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, C.. Interaction between lichen secondary metabolites and antibiotics against clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**. v. 22, p. 223-230, 2015.

BJERKE, J. W.; ELVEBAKK, A.; DOMÍNGUEZ, E.; DAHLBACK, A.. Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 337-344, 2005.

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

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C.. Invertebrados. **Guanabara Koogan**. 2ª Ed.. Rio de Janeiro. p. 1012, 2007.

BUSTINDUY, A.; KING, C.; SCOTT, J.; APPLETON, S.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; BETSON, M., STOTHARD, J. R.. HIV and schistosomiasis co-infection in African children. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 14, n. 7, p. 640-649. 2014.

BUSTINZA, F.. Antibacterial substances from lichens. **Endeavour**. v. 10, p. 95-99, 1951.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni : diretrizes técnicas 4. ed. – Brasília: **Ministério da Saúde**. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília: **Ministério da Saúde**. Cad. 10 p.19-29, 2010.

CAMEY, T.; VERDONK, N. H.. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. **Netherlands Journal of Zoology**. v.20, n.1, p. 93-121, 1969.

CARDIM, L. L.; FERRAUDO, A. S.; PACHECO, S. T. A.; REIS, R. B.; SILVA, M. M. N.; CARNEIRO, D. D. M. T.; BAVIA, M. E.. Análises espaciais na identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 27, n. 5, p. 899-908, 2011.

CARVALHO, O. S.; ANDRADE, R. M.; CORTES, M. I. N.. Ciclo vital de *Schistosoma mansoni* através do *Holochilus brasiliensis* (desmarest, 1818), em ambiente semi-natural (trematoda, Schistosomatidae; rodentia, *Cricetidae*). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 10, n. 5, p. 235-247, 1976.

CHANG, W.; ZHANG, M.; LI, Y.; LI, X.; GAO, Y.; XIE, Z.; LOU, H.. Lichen endophyte derived pyridoxatin inactivates *Candida* growth by interfering with ergosterol biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1850, p. 1762-1771, 2015.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de planta: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010.

CHAPMAN, P. M.. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.

CHAUMOT, A.; FERRARI, B.; GEFFARD, O.; GARRIC, J.. Ecotoxicology, Aquatic Invertebrates. **Biomedical Sciences**. Ed. 3^a. Elsevier. 2014. p. 284-288.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G.. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**. v. 89, p.137-149, 2002.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G.. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standrdized thin layer-chromaographic method. **Journal of Chromatography**. v. 72, p. 1113-1125, 1972.

D’ORS, A.; BARTOLOMÉ, M. C.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S.. Toxic risk associated with sporadic occurrences of *Microcystis aeruginosa* blooms from tidal rivers in marine and

estuarine ecosystems and its impact on *Artemia franciscana* nauplii populations. **Chemosphere**. v. 90, p. 2187-2192, 2013.

DAOUST, S. P.; MADER, B. J.; MAURE, F.; MCLAUGHLIN, J. D.; THOMAS, F.; RAU, M. E.. Experimental evidence of size/age-biased infection of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae) by an incompatible parasite species: Consequences for biological control. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 10, p. 1008-1012, 2010.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; PARAENSE, W. L.; POINTIER, J.; AMARISTA, M.; AYEK-KUMI, P. F. K.; BABIKER, A.; BARBOSA, C. S.; BRÉMOND, P.; CANESE, A. P.; SOUZA, C. P.; DOMINGUEZ, C.; FILE, S.; GUTIERREZ, A.; INCANI, R. N.; KAWANO, T.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N. J. S.; MIMPFOUNDI, R.; NJIOKOU, F.; PODA, J. N.; SENE, M.; VELÁSQUEZ, L. E.; YONG, M.; ADEMA, C. M.; HOFKIN, B. V.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S.. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with Implications Regarding Its Role as Host of the Human Bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biology and Evolution**. v. 18, n. 12, p. 2225-2239, 2001.

DUARTE, H. O.; DROGUETT, E. L.; MOURA, M. C.; GOMES, E. C.S.; BARBOSA, C. S.; BARBOSA,V.; ARAÚJO, M.. An ecological model for quantitative risk assessment for schistosomiasis: the Case of a patchy environment in the coastal tropical area of Northeastern Brazil. **Risk Analysis**. v. 34, n. 5, p. 831-846, 2014.

DUMITRASCU, M.. *Artemia salina*. **Balneo Research Journal**. v. 12, n. 4, p. 119-122, 2011.

FAVRE, T. C.; PEREIRA, A. P. B.; BECK, L. C. N. H.; GALVÃO, A. F.; PIERI, O. S.. School-based and community-based actions for scaling-up diagnosis and treatment of schistosomiasis toward its elimination in an endemic area of Brazil. **Acta Tropica**. v. 149, p. 155-162, 2015.

FERNANDES, R. F.; SPIELMANN, A. A.; OLIVEIRA, L. F. C.. Raman spectroscopy as a tool to the in situ study of three lichens species from Antarctica and Brazil. **Journal of Raman Spectroscopy**. v. 46, p. 70-75, 2014.

GAZZANO, C.; FAVERO-LONGO, S. E.; IACOMUSSI, P.; PIERVITTORI, R.. Biocidal effect of lichen secondary metabolites against rock-dwelling microcolonial fungi,

cyanobacteria and green algae. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 84, p. 300-306, 2013.

GENTILE, R.; SOARES, M. S.; BARRETO, M. G. M.; GONÇALVES, M. M. L.; D'ANDREA, P. S.. The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Schistosomiasis**. Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, p. 231-254, 2012.

GERDOL, R.; MARCHESINI, R.; IACUMIN, P.; BRANCALEONI, L.; Monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors. **Chemosphere**. v. 108, p. 388–395, 2014.

GHATE, N. B.; CHAUDHURI, D.; SARKAR, R.; SAJEM, A. L.; PANJA, S.; ROUT, J.; MANDAL, N.. An antioxidant extract of tropical lichen, *Parmotrema reticulatum*, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. **Plos One**. v. 8, Issue 12, 2013.

GOMES, E. C. S.; LEAL-NETO, O. B., OLIVEIRA-JUNIOR, F. J. M.; CAMPOS, J. V.; SOUZA-SANTOS, R.; BARBOSA, C. S.. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v. 14, n. 101, 2014.

GONÇALVES, F.; COUTINHO, A.; SANTANA, W.; BARBOSA, C. S.. Esquistossomose Aguda, de Caráter Episódico, na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Caderno de Saúde Pública**. v. 7, n. 3, p. 424-425, 1991.

GRAMMOU, A.; PAPADIMITRIOU, C.; SAMARAS, P.; VASARA, E.; PAPADOPOULOS, A. I.. Effect of municipal waste water effluent upon the expression of Glutathione S-transferase isoenzymes of brine shrimp *Artemia*. **Chemosphere**. v. 84, p. 105-109, 2011.

GRUMEZESCU, V.; SOCOL, G.; GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M.; FICAI, A.; TRUȘCĂ, R.; BLEOTU, C.; BALAURE, P. C.; CRISTESCU, R.; CHIFIRIUC, M. C.. Functionalized antibiofilm thin coatings based on PLA–PVA microspheres loaded with usnic acid natural compounds fabricated by MAPLE. **Applied Surface Science**. v. 302, p. 262-267, 2014.

GRYSEELS, B.. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, Issue 2, p. 383-397, 2012.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W.. A química dos liquens. **Química Nova**. v. 21, n. 6, p. 110-125, 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest Usnic Acid. **Phytochemistry**. v. 61, p. 729-736, 2002.

IORDACHE, F.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M.; CURUȚIU, C.; DIȚU, L. M.; SOCOL, G.; FICAI, A.; TRUȘCĂ, R.; HOLBAN, A. M.. Gamma-cyclodextrin /usnic acid thin film fabricated by MAPLE for improving the resistance of medical surfaces to *Staphylococcus aureus* colonization. **Applied Surface Science**. v. 336 p. 407-412, 2015.

JOSEPH, A.; LEE, T.; MOLAND, C. L.; BRANHAM, W. S.; FUSCOE, J. C.; LEAKEY, J. E. A.; Allaben, W. T.; Lewis, S. M.; Ali, A. A.; DESAI, V. G.. Effect of (+)-usnic acid on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific oligonucleotide microarray in liver of B6C3F 1 mice. **Mitochondrion**. v. 9, p. 149-158, 2009.

KARABACAK, R. B.; TAY, T.; KIVANC, M.. Preparation of novel antimicrobial polymer colloids based on (+)-usnic acid and poly(vinylbenzyl chloride). **Applied Surface Science**. v. 302, p. 262-267, 2014.

KATZ, N.. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**. v. 108, p. 69-71. 2008.

KATZ, N.; ALMEIDA, K.. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 1, p. 38-43. 2003.

KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L.. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. *Malacologia* 34, 25-32, 1992.

KAWANO, T.. Embriologia. In: BARBOSA, F. **Tópicos em Malacologia Médica**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 157-200. 1995.

KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C.. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: CARVALHO, O. S.;

COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose uma Visão Multidisciplinar. **Ed. FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 347-391, 2008.

KING, C. H.; BERTSCH, D.. Historical perspective: snail control to prevent schistosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 4, p. 1-6, 2015.

KOHLHARDT-FLOEHR, C.; BOEHM, F.; TROPPE, S.; LADEMANN, J.; TRUSCOTT, T. G.. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**. v. 101, p. 97-102, 2010.

KOSANIĆ, M., RANKOVIĆ, B.; STANOJKOVIĆ, T.; RANČIĆ, A.; MANOJLOVIĆ, N.. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. **Food Science and Technology**. v. 59, p. 518-525, 2014.

MALTBY, L.; CALOW, P.. The application of bioassays in the resolution of environmental problems: past, present and future. **Hydrobiologia**. v. 188, n. 189, p. 65-76, 1989.

LAMBERTUCCI, J. R.. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 4, p. 422- 435, 2010.

LEAL-NETO, O. B.; GOMES, E C. S.; JUNIOR, F. J. M. O.; ANDRADE, R.; REIS, D. L.; SOUZA-SANTOS, R.; BOCANEGRA, S.; BARBOSA C. S.. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 29, n. 2, p. 357-367, 2013.

LEAL-NETO, O. B.; GALVÃO, T. Y. C.; ESTEVES, F. A. M.; GOMES, A. M. A. S.; GOMES, E. C. S.; ARAÚJO, K. G. C.; BARBOSA, C. S.. Spatial analysis of schistosomiasis human cases in the horticultural community of Zona da Mata of Pernambuco state, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 15, n. 4 p. 771-780, 2012.

LEANDRO, L. F.; MUNARI, C. C.; SATO, V. L. F. L.; ALVES, J. M.; OLIVEIRA, P. F.; MASTROCOLA, D. F. P.; MARTINS, S. P. L.; MORAES, T. S.; OLIVEIRA, A. I.; TOZATTI, M. G.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C.. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research**. v. 753, p. 101-106, 2013.

LEE, E. F.; YOUNG, N. D.; LIM, N. T. Y.; GASSER, R. B.; FAIRLIE, W. D.. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**. v. 30, Issue 2, p. 75-84, 2014.

LIMA, L. C. Famílias Chilinidae, Ancyliidae, Physidae e Lymnaeidae. In: BARBOSA, F. **Tópicos em Malacologia Médica**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 80-112, 1995.

LIMA, N. M. F.; SANTOS, A.F.; PORFÍRIO, Z.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**. v. 83, p. 43-47, 2002.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A. E. G.. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 199-206, 2005.

LUZ, J. S. B.; OLIVEIRA, E. B.; MARTINS, M. C. B.; SILVA, N. H.; ALVES, L. C.; SANTOS, F. A. B.; SILVA, L. L. S.; SILVA, E. C.; MEDEIROS, P. L.. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes forms treated *in vitro* with usnic acid. **The Scientific World Journal**. v. 25, p. 1-7, 2015.

MANOJLOVIĆ, N.; RANKOVIĆ, B.; KOSANIĆ, M.; VASILJEVIĆ, P.; STANOJKOVIĆ, T.. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1166-1172, 2012.

MARTINELLI, A; BAKRY, A.; D'ILARIO, L.; FRANCOLINI, I.; PIOZZI, A.; TARESCO, V.; Release behavior and antibiofilm activity of usnic acid-loaded carboxylated poly (L-lactide) microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 88, p. 415–423, 2014.

MARTINS, M. C. B.; SILVA, M. C.; SILVA, L. R. S.; LIMA, V. L. M.; PEREIRA, E. C.; FALCÃO, E. P. S.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H.. Usnic cid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Plos One**. v. 9, n. 11, 2014.

MARTINS M. C. B.. Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Líquens. [Tese]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Universidade Federal de Pernambuco, p. 300, 2013.

MARTINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C. C.; JUNIOR, A. N. R.; ALENCAR, C. H.; BEZERRA, F. S. M.; HEUKELBACH, J.. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **International Journal for Parasitology**. v. 44, p. 1055-1062, 2014.

MASSARA, C. L.; ENK, M. J.; CALDEIRA, R. L.; MENDONÇA, C. L. F.; SCHOLTE, R. G. C.; CARVALHO, O. S.. Ocorrência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em parques da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical** v. 41, n. 4, p. 471-479, 2012.

MCMURRAY, J. A.; ROBERTS, D. W.; GEISER, L. H.. Epiphytic lichen indication of nitrogen deposition and climate in the northern rocky mountains, USA. **Ecological Indicators**. v. 49, p. 154-161, 2015.

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.

MUNIZ, J. M.; BORGES, C. R. B.; BEGHINI, M.; ARAÚJO, M. S.; ALVES, P. M.; LIMA, L. M. PEREIRA, S. A .; NOGUEIRA, R. D.; NAPIMOGA, M. H.; JUNIOR, V. R.; RODRIGUES, D. B. R.. Galectin-9 as an important marker in the differential diagnosis between oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia and oral lichen planus. **Immunobiology**. v. 220, p. 1006-1011, 2015.

MUSHEGIAN, A. A.; PETERSON, C. N.; BAKER, C. C. M.; C.; PRINGLE, A.. Bacterial diversity across individual Lichens. **Applied and Environmental Microbiology**. v.77, n. 12, p. 4249-4252, 2011.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. **Atheneu**. Ed. 11ª. São Paulo. 2012. 498 p.

NOYA, O.; KATZ, N.; POINTIER, J. P.; THERON, A.; NOYA, B. A.. Schistosomiasis in America. In: C. Franco-Paredes, J.I. Santos-Preciado. (Org.). Neglected Tropical Diseases. Ed. 1ª. **Springer-Verlag Wien**. p. 11-43. 2015.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V.. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**. v. 144, p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, V. B.; MELO, A. G. S.; OLIVEIRA, C. C. C.; LIMA, A. S.; CARVALHO, C. D.; ALEGRETTI, S. M.; MELO, C. M.; MADI, R. R.; JERALDO, V. L. S. Schistosomiasis mansoni in urban Northeast Brazil: influence of rainfall regime on the population dynamics of *Biomphalaria* sp.. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n. 5, p. 654-657, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R.. 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 46, p. 342-350, 2000.

OLLIARO, P. L.; VAILLANT, M. T.; BELIZARIO, V. J.; LWAMBO, N. J. S.; OULDABDALLAHI, M.; PIERI, O. S.; AMARILLO, M. L.; KAATANO, G. M.; DIAW, M.; DOMINGUES, A. L. C.; FAVRE, T. C.; LAPUJADE, O.; ALVES, F.; CHITSULO, L.. A multicentre randomized controlled trial of the efficacy and safety of single-dose praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for treating intestinal schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 5, issue 6, 2011.

OLVEDA, D. U.; OLVEDA, R. MCMANUS, D. P.; CAI, P.; CHAU, T. N. P.; LAM, A. K.; LI, Y.; HARN, D. A.; VINLUAN, M. L.; ROSS, A. G. P.. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 28, p. 193-203, 2014.

ÖZVAN, A.; DINÇER, I.; AKIN, M.; OYAN, V.; TAPAN, M.. Experimental studies on ignimbrite and the effect of lichens and capillarity on the deterioration of Seljuk Gravestones. **Engineering Geology**. v.185, p. 81-95, 2015.

PAOLI, L.; MUNZI, S.; GUTTOVÁ, A.; SENKO, D.; SARDELLA, G.; LOPPIA, S.. Lichens as suitable indicators of the biological effects of atmospheric pollutants around a municipal solid waste incinerator (S Italy) **Ecological Indicators**. v. 52, p. 362-370, 2015.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I.. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PARAENSE, W. L.. Shell versus anatomy in planorbid systematics *Australorbis glabratus*. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 21, n. 3, p. 163-170, 1961.

PARAENSE, W. L.. Fauna Planorbídica do Brasil, In:(LACAZ, C.S, BARUZZI, R.G & SIQUEIRA, J.W). **Introdução à Geografia Médica do Brasil**. Edgard Blucher & USP, São Paulo. p. 213-23, 1972.

PERNAMBUCO.Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Programa de Enfretamento das Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco **SANAR – 2011/ 2014/** Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde – Recife. 2ª Edição. 44 p. 2014.

PIERI, O.; FAVRE, T. C.; BARBOSA, C. S.; LEAL-NETO, O. B.. Os moluscos transmissores e outros moluscos de importância médica. In: BARBOSA, C. S; GOMES, E. C; LEAL NETO, O. **Manual prático para diagnóstico e controle da esquistossomose**. Recife: Ed. Universitária, Edição 2ª. p. 31-51, 2012.

PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L.. The Pampulha reservoir remains a potential urban focus of schistosomiasis mansoni in Brazil: changes in the occurrence patterns of *Biomphalaria* species and a new record of the parasite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n. 4, p. 478-483, 2013.

PINTO, C.; ALMEIDA, A. F.. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz** v. 40, p. 291-311, 1994.

POINTIER, J. P.. The introduction of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) to the island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**. v. 54, p. 13-18, 1993.

POINTIER, J. P.; DAVID, P.. Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora. **Biological Control**. v. 29, p. 81-89, 2004.

PORTAL DETERMINANTE SOCIAL DA SAÚDE: **Série panorama das doenças negligenciadas: Nordestinos morrem mais em decorrência da esquistossomose**. Disponível em: < <http://dssbr.org/site/2013/04/serie-panorama- das doencas-negligenciadas-nordestinos-morrem-mais-em-decorrencia-da esquistossomose/> > Acesso em 11 jun. 2015.

PROCÓPIO, T. F.; FERNANDES, K. M.; PONTUAL, E. V.; XIMENES, R. M.; OLIVEIRA, A. R. C.; SOUZA, C. S.; MELO, A. M. M. A.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H.. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**. v. 10, n. 5, doi:10.1371/journal.pone.0126612, 2015.

PROKSA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N. A.; LIPTAJ, T.. (-)- Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**. v. 51, n. 3, p. 195-196, 1996.

PROKSA, B.; ADAMCOVA, J.; STURDIKOVA, M.; FUSKA, J.. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potential of proteolytic enzymes. **Phamazie**. v. 49, p. 282-283, 1994.

RAND, G.M.; WELLS, P.G. & MCCARTY, L.S.. Introduction to aquatic toxicology. In: Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment (G. M. RAND), , **Washington**: Taylor & Francis. p. 3-67, 1995.

RAPADO, L. M.; LOPES, P. O. M.; YAMAGUCHI, L. F.; NAKANO, E.. Ovicidal effect of Piperaceae species on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 55, n. 6, p. 421-424, 2013a.

RAPADO, L. N.; PINHEIRO, A. SÁ.; LOPES, P. O. M. V.; FOKOUE, H. H.; F, H. H.; SCOTTI, M. T.; MARQUES, J. V.; OHLWEILER, F. P.; BORRELY, S. I.; PEREIRA, C. A. B.; KATO, M. J.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 6, p. 2251, 2013b.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; PIRES, O. F.; KATO, M. J.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T.. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**. v. 85, p. 66-72, 2011.

RAVAGLIA, L. M.; GONÇALVES, K.; OYAMA, N. M.; COELHO, R. G.; SPIELMANN, A.; HONDA, N. K.. *In vitro* radical-scavenging activity, toxicity against *A. salina*, and NMR profiles of extracts of lichens collected from Brazil and Antarctica. **Química Nova**. v. 37, n. 6, p. 1015-1021, 2014.

REY, L.. Bases da parasitologia médica. **Guanabara Koogan**. 3ª Ed.. Rio de Janeiro. p. 930, 2011.

REY, L.. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**. v. 53, p. 13-25, 1993.

ROCHA, T. J. M.; FILHO, B. P. N.; NOÉ, B. D. R.; JÚNIOR, C. P. V.; COSTA, G. N.; ARAGÃO, M. B.; SANTOS, A. F.. Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos Adultos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (gastropoda, planorbidae). **Revista de Patologia Tropical**. v. 42, n. 2, 2013.

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.

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

SANTOS, A. F.; CAVADA, B. S.; ROCHA B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; SANT'ANA, A. E. G.. Toxicity of some glucose/manose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 794-798, 2010.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C. G. SILVA, N. H.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.. Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 64, p. 154-160, 2006.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F. ; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H. DA ; HONDA, N. K. ; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 15, n.5, p. 355-361, 2005.

SCHOLTE, R. G. C.; GOSONI, L.; MALONE, J.B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P.. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**. v. 132, p. 57-63, 2014.

SCHOLTE, R. C. G.; 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, n.3 p. 95-101, 2012.

Scientific American Brasil. Estratégias do futuro para enfrentar problemas do passado. v. 106, p. 48-51, 2011.

SHTRO, A. A.; ZARUBAEV, V. V.; LUZINA, O. A.; SOKOLOV, D. N.; KISELEV, O. I.; SALAKHUTDINOV, N. F.. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 6826-6836, 2014.

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

SOKOLOV D. N.; ZARUBAEV V. V.; SHTRO A. A.; POLOVINKA M. P.; LUZINA O. A.; KOMAROVA N. I. , SALAKHUTDINOV N. F., KISELEV O. I.. Anti-viral activity of (-) / (+) usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1) 2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 7060-7064, 2012.

SPATZ, L.; VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; NETO, E. D.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. G.; CARVALHO, O.S.. Molecular study of similar *Biomphalaria* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, suppl I. p. 169-170, 1998.

SPIELMANN, A. A.. Fungos liquenizados (liquens). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. **Instituto de Botânica – IBt**. São Paulo, p. 13, 2006.

SU, Z.; MO, Z.; LIAO, J.; FENG, X.; LIANG, Y.; ZHANG, X.; LIU, Y.; CHEN, X.; CHEN, Z.; SU, Z.; LAI, X.. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. **International Immunopharmacology**. v. 22, p. 371-378, 2014.

TARESCO, V.; FRANCOLINI, I.; PADELLA, F.; BELLUSCI, M.; BONI, A.; INNOCENTI, C.; MARTINELLI, A.; D'ILARIO, L.; PIOZZI, A.. Design and characterization of antimicrobial usnic acid loaded-core / shell magnetic nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**. v. 52, p. 72-81, 2015.

TAYLOR, T. N.; KRINGS, M.; TAYLOR, E. L.. Lichens. **Fossil Fungi**, p. 201-220, doi:10.1016/B978-0-12-387731-4.00014-1. 2015.

USEH, M. F.. Control of Shistosomiasis. In: ROKNI, M. B. Shistosomiasis. 1. ed. **Croatia: Rijeka**. cap. 4, p. 73-102, 2012.

VALADARES, M. C.. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a ``era do teste dl50``. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, 2006.

VARÓ, I.; NAVARRO, J. C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L.. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**. v. 48, p. 563-569, 2002.

VASCONCELOS, T. L.; OLIVEIRA, A. K.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.. The lichen *Cladonia verticillaris* retains and modifies mineral soil particles inside the thallus. **Catena**. v. 135, p. 70-77, 2015.

VATNE, S.; ASPLUND, J.; GAUSLAA, Y.. Contents of carbon based defence compounds in the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* vary along environmental gradients. **Fungal Ecology**. v. 4, p. 350-355, 2011.

VERSONNEN, B.; SOBANSKA, M.; CESNAITIS, R.. Ecotoxicology aquatic. **Biomedical Sciences**. Ed. 3^a. Elsevier. p. 281-283, 2014.

VIDAL, L. M.; BARBOSA, A. S.; RIBEIRO, R. M. C.; SILVA, L. W. S.; VILELA, A. B. A.; PRADO, F. O.. Considerações sobre esquistossomose mansônica no município de Jequié, Bahia. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40, n. 4, p. 367-382, 2011.

VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S.. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil.. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 95, n. 5, p. 57-66, 2000.

WAT, L. V. D.; FORBES, P. B. C.. Lichens as biomonitors for organic air pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 64, p- 165-172, 2015.

WEERAKOON, G.. Fascinating lichens of Sri Lanka. Colombo. Sri Lanka: **Ceylon Tea Services PLC**. p. 184, 2015.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis. Fact sheet number 115. 2016.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013. **Weekly Epidemiological Record**. v. 90, n. 5, p. 25-32. 2015.

WHO. World Health Organization. The control of schistosomiasis. Second report of the who expert committee. **Who technical Report Series, 830**. World Health Organization. 1993.

WHO. World Health Organization. Report of the Scientific working group on plant molluscicide e guidelines for evaluation of plant molluscicides. **World Health Organization**. (TDR/SCH- SWE. (4)/83.3), 1983.

WHO. World Health Organization. Molluscicide screening and evaluation. **Bull world health organ**. v. 33, p. 567-581, 1965.

YOUSUF, A.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN. Lichens: Chemistry and biological activities. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 43, p. 223-259, 2014.

ANEXOS

Table 1. *Biomphalaria glabrata* embryos mortality treated with potassium usnate at different embryonary stages.

Groups	Unviable in Stage Embryonic (%)			
	Blastula	Gastrula	Trochophore	Veliger
Control 1	0.66±0.57	1.33±0.57	1.33±0.57	1.33±0.57
Niclosamide				
1.0	100	100	100	100
Usnate potassium (µg/mL)				
1	0.66±0.57	7.33±2.30	3.00±1.00	2.66±0.57
1.5	1.33±0.57	23.33 ^b ±1.52	7.33±1.52	16.67 ^a ±2.51
2	2.66 ±1.15	24.33 ^b ±14.19	15.0 ^c ±3.60	24.00 ^b ±10.58
2.5	24.5 ^b ±10.41	27.33 ^b ±4.16	27.00 ^c ±7.00	26.00 ^b ±9.64
3	26.0 ^b ±4.35	48.67 ^c ±14.43	32.67 ^c ±5.50	50.67 ^c ±14.22
3.5	33.3 ^c ±2.51	94.33 ^c ±2.08	34.67 ^c ±1.15	72.67 ^c ±5.85
4	37.6 ^c ±3.21	100 ^c	52.33 ^c ±6.11	94.33 ^c ±2.08
4.5	41.0 ^c ±4.35	-	100 ^c	100 ^c
5	48.3 ^c ±20.11	-	-	-
5.5	97.0 ^c ±2.64	-	-	-
6	100 ^c	-	-	-

Values expressed as mean (± standard deviation) four to five eggs mass. Control 1: filtered and dechlorinated water; NCL: 1% niclosamide. Usnate potassium concentrations in µg/mL. ^a P<0.05; ^b P<0.001; and ^c P<0.0001 versus Control 1.

Table 2. Lethal concentration to all embryonic stages snails of *Biomphalaria glabrata* exposed to potassium usnate.

Embryonic stages	Lethal Concentration (µg/mL)
	LC ₅₀
Blastula	5.22
Gastrula	3.21
Trochophore	3.58
Veliger	2.79

Usnic acid from *Cladonia substellata* as Schistosomiasis vector controls

¹Araujo, H.D.A; ¹Silva, H.A.M.F; ¹Carvalho, A.N; ²Silva, L.R.S; ¹Silva, N.H; ²Melo, A.M.M.A; ^{2,3}Martins, M.C.B; ¹Lima, V.LM.

¹Dep de Bioquímica, UFPE, PE; ²Dep de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, PE ³Dep de Ciências Geográficas, UFPE, Recife, PE, Brazil.

INTRODUCTION: The search of alternative compounds to control tropical diseases such as schistosomiasis has pointed to secondary metabolites derived from natural sources. One of the main ways to control schistosomiasis in Brazil is the elimination or control of *Biomphalaria glabrata*. Currently, niclosamide, is the most effective compound employed in schistosomiasis control program. However there are several negative aspect of your use, including toxicity to other organisms. The usnic acid, obtained from lichen, has presented as a promising alternative since it exhibits different biological activities. **OBJECTIVE:** The present study evaluated the toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* to *B. glabrata* embryos in the blastulae stage. **MATERIAL AND METHODS:** The usnic acid was isolated and purified from *Cladonia substellata*. Embryotoxicity assay was performed as approximately 100 embryos in the blastula stage of *B. glabrata* and placed in Petri dishes with usnic acid (1.1; 1.2; 1.25; 1.5; 2.0 µg/mL) or tap water (control) for 24 hours. The mortality and hatched was determined by observation for 7 days using a stereomicroscope. The experiments were performed in triplicate for each of the usnic acid concentrations. **RESULTS AND DISCUSSION:** The concentration of 2.0 µg/mL resulted in 100% dead animals after 24 hours. Majority of embryos treated with usnic acid at concentrations of 1.1 (0,6%), 1,2 (20,3%), 1,25 (41,3%) e 1,5 (51%) did not develop completely. The lethal dose was approximately 1.5 µg/mL. The ideal molluscicidal should eliminate the embryos and adults mollusks too. **CONCLUSION:** The usnic acid eliminated embryos of *B. glabrata* in the stage of blatulae shown to be a promising molluscicidal. No doubt more studies are needed to clarify its potential value to control schistosomiasis.

Keywords: Lichen, Toxicity, Vector, Schistosomiasis.

Supported by: CNPq, CAPES and FACEPE.

EMBRYOTOXICITY OF USNIC ACID AND POTASSIUM USNATE ON *Biomphalaria glabrata* VECTOR OF SCHISTOSOMIASIS

Araújo, HDA¹; Albuquerque, HH¹; Silva, HAMF¹; Carvalho, AN¹; Silva, LRS²,
Pereira, ECG³; Silva, NH¹; Melo, AMMA²; Martins, MCB^{2,3}; Lima, VLM¹.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Departamento de Biofísica e Radiobiológico, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil. ³Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

The natural substances has been researched as an alternative to population control *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), the main vector of schistosomiasis in Brazil. In this context, liquênicas substances has proved to be promising due to their biological potential. Therefore, the aim of this study was to assess the teratogenic potential of usnic acid and salt (potassium usnate) obtained from lichen *Cladonia substellata* Vainio on embryos in the blastocyst phase of *B. glabrata*. The usnic acid was obtained from lichen the stem (60 g) subjected to successive extractions with cold diethyl ether. The usnic acid was isolated and purified on a silica column eluted with chloroform/hexane (80:20). To obtain usnate was used 200 mg of usnic acid, partially dissolved in distilled water at 40 °C, dripping potassium hydroxide (10%) until complete solubilization and subsequent lyophilization. Samples were identificads by thin layer chromatography and infrared. For embryotoxicity tests embryos were used (n=100) *B. glabrata* exposed for 24 hours to different concentrations of usnic acid (1, 1.2, 1.25, 1.5, 1.7, and 2 µg/ml) and usnato (1, 1.5 2, 2.5, 5 and 6 µg/ml). The parameters analyzed were infeasibility (mortalidadede, malformation) and viability (hatched). All tests were performed in triplicate. The usnic acid in concentrations of 1.25 to 1.7 µg/ml showed mortality of 33.2 and 89.3%, while the malformation was 7.9 and 5%, respectively. Treatment with usnato showed malformation (6.2%) and 93.9 mortality at the highest dose used (6 µg/ml). The impossibility was dose dependent for both substances. Therefore, usnic acid and potassium usnate proved promising substances in the control population of *B. glabrata*

Key Words: Embryotoxicity, lichen, *Biomphalaria glabrata*.

Financial support: CNPq, CAPES and FACEPE.



ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE A *Biomphalaria glabrata*, (Say,1818)

ARAÚJO, H. D. A¹; ALBUQUERQUE, H. H.¹; SILVA, H. A. M. F.¹; CARVALHO, A. N.¹;
SILVA, L. R. S.²; PEREIRA, E. C. G; SILVA, N. H.¹; MELO, A. M. M. A.²; MARTINS, M.
C. B.^{1,3}; LIMA, V. L. M.¹.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. ²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. ³Departamento de Ciências Geográficas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Uma das principais formas de controlar a esquistossomose mansônica é a eliminação ou controle do molusco *Biomphalaria glabrata*. Este controle acontece por meio do moluscicida sintético niclosamida, porém este composto apresenta alto custo, resistência dos caramujos e baixa seletividade, causando desequilíbrio ecológico local. Desta forma, a procura de substâncias biodegradáveis tem aumentado o interesse pelo uso de moluscicidas de origem natural. O ácido úsnico (USN), obtido dos líquens, apresenta-se como promissora alternativa, uma vez que apresenta diferentes atividades biológicas. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do ácido úsnico obtido do líquen *Cladonia substellata* sobre embriões e moluscos adultos de *B. glabrata*. O ácido úsnico foi obtido por meio de talos inatura do líquen *C. substellata*. Para a atividade moluscicida foram utilizados dez espécimes adultos de *B. glabrata* medindo de 12 a 16 mm de diâmetro oriundos do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os caramujos foram expostos as concentrações de 1, 2, 2.5, 3, µg/mL por 24 horas, onde foi verificado a mortalidade. As desovas com os embriões (N=100) foram coletadas desta mesma população de caramujos e expostas ao USN por 24 horas nas concentrações de 1; 1,2; 1,25; 1,5; 1,7e 2µg/mL. Os embriões foram observados por oito dias consecutivos para verificação da viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). Foi utilizado um grupo controle com água e outro com niclosamida (1µg/mL). O USN provocou 100% de mortalidade nas concentrações de 3 e 2µg/mL para os moluscos adultos e na fase embrionária respectivamente. Estas concentrações estão abaixo da recomendada pela organização mundial de saúde para futuros ensaios em campo. Portanto, ácido úsnico utilizado neste estudo mostrou-se um moluscicida altamente eficaz quando testado frente a *Biomphalaria glabrata*, sendo recomendada para futuros ensaios em campo.

Palavras - Chave: Vetor; Líquens; Esquistossomose.

Órgãos de Financiamento: CNPq, CAPES e FACEPE.



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni*

Carvalho, A. N.¹, Melo, A. M. M. A.², Amâncio, F. F.², **Araujo, H. D. A.¹**, Silva, H. A. M. F.¹,
Albuquerque, M. C. P. A.³, Aires, A. L.³, Martins, M. C. B.⁴, Silva, N. H.¹.

¹Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, ²Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco; ³Departamento de Biofísica e Radiobiologia Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco, ⁴Departamento de Ciências Geográficas da Universidade Federal de Pernambuco; alexsandra2906@hotmail.com; nhsilva@uol.com.br

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária que apresenta alto índice de prevalência mundial sendo considerada um problema de saúde pública. Uma estratégia para o controle da doença é o combate aos seus vetores e suas formas intermediárias com o uso de substâncias sintéticas ou naturais. Neste cenário os derivados liquênicos por serem de origem natural e apresentarem relativa toxicidade frente a alguns organismos despertaram o interesse de avaliar sua ação cercaricida. Neste sentido, o ácido úsnico (USN), pelas suas propriedades metabólicas frente aos moluscos nos levou a avaliar seu grau de letalidade sobre cercárias de *Schistosoma mansoni*. A partir do extrato etéreo do líquen *Cladonia substellata* foi purificado o USN no Laboratório de Produtos Naturais. Para os ensaios cercaricidas, o USN foi dissolvido em DMSO (0,5%) e as cercárias foram avaliadas nas concentrações de 10, 7,5, 5 e 1 µg/mL por 2 h. Os grupos controles foram feitos com água filtrada, água filtrada com DMSO (0,5%) e niclosamida (1µg/mL). O comportamento das larvas foi avaliado após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e os testes foram realizados em triplicata. A atividade cercaricida do USN demonstrou que ocorreu mortalidade em todas as concentrações testadas. A concentração de 10 µg/mL do USN ocasionou 100% de mortalidade em 90 min de exposição, enquanto as concentrações de 7,5 e 5 µg/mL apresentaram uma mortalidade superior a 50% nos primeiros 30 min. Na concentração de 1 µg/mL as cercárias permaneceram viáveis por 90 min, porém com alterações de mobilidade. Após 2h de exposição ocorreu mortalidade inferior a 50%. A toxicidade do USN nas diferentes concentrações testadas causou significativa letalidade sobre cercárias de *S. mansoni*, exceto na concentração de 1 µg/mL, quando comparado aos grupos controles. O USN demonstrou ser uma substância promissora com potencial efeito cercaricida, estudos complementares serão realizados para analisar sua atividade sobre o verme adulto de *S.mansoni*.

Palavras - chave: composto liquênico, toxicidade, cercaricida.
Órgão de Financiamento: CNPq; FACEPE; CAPES.



ATIVIDADE DOS ÁCIDOS LIQUÊNICOS SALAZÍNICO E BARBÁTICO SOBRE CERCÁRICAS DE *Schistosoma mansoni*

SILVA, H. A. M. F¹; **ARAUJO, H. D. A¹**; SÁ, J.L. F¹; SIQUEIRA, W. N²; CARVALHO, A. N¹; MARTINS, M. C. B¹; AIRES, A. L³; ALBUQUERQUE, M. C. P. A³; MELO, A. M. M. A⁴; SILVA, N. H¹.

¹Departamento de Bioquímica – CCB – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Energia Nuclear – CTG – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. ³Departamento de Medicina Tropical – CCS - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. ⁴Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CCB – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

A esquistossomose, doença parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*, é considerada um grave problema de saúde pública. A transmissão ao homem ocorre pela penetração da forma cercariana do parasito através da pele ou mucosas. Visando uma nova alternativa para as substâncias sintéticas, a aplicação ambiental de substâncias biodegradáveis que combatam o parasito em sua forma larval tem sido pesquisada. Neste contexto, substâncias liquênicas apresentam diferentes atividades biológicas, dentre elas a antiparasitária, mostrando-se como uma nova alternativa. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade cercaricida (*S.mansoni*) dos ácidos liquênicos salazínico e barbático. As substâncias liquênicas foram isoladas e purificadas da *Ramalina complanata* e *Cladonia salzmännii*, respectivamente. Moluscos *B. glabrata* (n=15) infectados permaneceram sob luz artificial (60W) por 2h até a eliminação de cercárias. Uma suspensão cercariana (n=100) foram expostas por 2h (2mL) aos ácidos, salazínico (100; 10 e 1 µg/mL) e barbático (100; 10; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL) solubilizados em DMSO (0,5%). Como controle negativo foi usado DMSO (0,5%) e água destilada, e para o positivo niclosamida (1 µg/mL). O percentual de viabilidade foi observado. O ácido salazínico não foi ativo em nenhuma concentração, porém o ácido barbático apresentou mortalidade de 100% para as concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL, e 62% e 46% para as concentrações de 0,5 e 0,25 µg/mL, respectivamente. Alterações de motilidade e aderência foram observadas nas cercárias sobreviventes, bem como separação de corpo cercariano e cauda nas concentrações de 100 e 10 µg/mL. O ácido barbático demonstrou uma elevada toxicidade sobre cercárias de *S. mansoni*, podendo este ser considerado como uma ferramenta promissora no combate à esquistossomose.

Palavras – Chave: Esquistossomose; produtos naturais; líquens.

Órgãos de Financiamento: CNPq; FACEPE; CAPES.

BMC Proceedings

Submission Guidelines

Before you submit your manuscript, please ensure that you have satisfied all formatting requirements and have all the required supporting information as listed below. If you have any questions about the submission process or preparation of your manuscript, please contact info@biomedcentral.com.

Manuscripts cannot be submitted to more than one journal at a time and cannot be submitted by anyone other than one of the authors. The submitting author takes responsibility for the submission on behalf of all authors. All authors must consent to the submission.

1. Correctly format your manuscript

BMC Proceedings publishes the following article types. Please click on the relevant article type below for instructions on how to format your manuscript.

Figures

Figures must be uploaded as separate files and not embedded in your manuscript.

See [Preparing figures](#) for more information.

Tables

Smaller tables that are considered integral to the manuscript can be pasted at the end of the manuscript file in A4 portrait or landscape format. Larger tables can be uploaded separately as additional files.

See [Preparing tables](#) for more information.

Additional files

You may provide datasets, tables, movies, or other information as additional files. These will be published along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes.

The maximum file size for additional files is 20MB each, and files will be virus-scanned on submission.

See [Preparing additional files](#) for more information.

2. Prepare supporting information

Please make sure you have the following information available before you attempt to submit your manuscript:

Author information

Full names and email addresses of all co-authors on your manuscript.

Cover letter

A cover letter that includes the following information, as well as any additional information requested in the instructions for your specific article type (see main manuscript section above):

- An explanation of why your manuscript should be published in *BMC Proceedings*
- An explanation of any issues relating to journal policies
- A declaration of any potential competing interests
- Confirmation that all authors have approved the manuscript for submission
- Confirmation that the content of the manuscript has not been published, or submitted for publication elsewhere (see our Duplicate publication policy)
- If you are submitting a manuscript to a particular special issue, please refer to its specific name in your covering letter

You may suggest potential peer reviewers for your manuscript. If you wish to do so, please provide institutional email addresses where possible, or information which will help the Editor to verify the identity of the reviewer (for example an ORCID or Scopus ID). Intentionally falsifying information, for example, suggesting reviewers with a false name or email address, will result in rejection of your manuscript and may lead to further investigation in line with our misconduct policy. See our Editorial policies for guidance on suggesting peer reviewers.

Excluding peer reviewers

During submission you may enter details of anyone who you would prefer not to review your manuscript.

The following information must be included under the Declarations section of your manuscript. You will be asked about this information during submission of your manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must include a statement on ethics approval and consent. Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our Editorial policies for more information.

Consent to publish

All manuscripts containing any individual person's data in any form require consent to publish from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian.

See our Editorial policies for more information.

Availability of data and materials

For all journals, you must include an 'Availability of data and materials' section within the 'Declarations' of your manuscript detailing where the data supporting your findings can be found. For some journals, deposition of your data is mandatory (see information on individual article types above). For journals where data deposition is not mandatory, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely be either deposited in publicly available repositories or presented in the main paper or additional supporting files. If you do not wish to share your data, please state that data will not be shared, and state the reason.

See our Editorial policies and Preparing your manuscript for more information.

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section. You will be asked about this during submission of your manuscript.

See our Editorial policies for more information on competing interests.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared.

3. Agree to conditions of submission, BioMed Central's copyright and license agreement and article-processing charge (APC)

Copyright and license agreement

During submission, you will need to accept and confirm the following conditions of submission:

- All authors of the manuscript have read and agreed to its content and are accountable for all aspects of the accuracy and integrity of the manuscript in accordance with ICMJE criteria
- That the manuscript is original, has not already been published in a journal, and is not currently under consideration by another journal
- That you agree to the terms of the BioMed Central Copyright and License Agreement and Open data policy, which we strongly recommend you read. For authors who are

prevented from being copyright holders (for instance where Crown Copyright applies or researchers are US government employees) BioMed Central can accommodate nonstandard copyright lines. If this applies to you, please contact us and provide details of your situation

- For more information see our Copyright and license policy

Article-processing charge

An article-processing charge (APC) applies for each article accepted for publication in *BMC Proceedings*. For details of the journal's APC see *About BMC Proceedings* and for answers to some frequently-asked questions please see our article-processing charge page.



CHEMOSPHERE

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.3
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.6



ISSN: 0045-6535

DESCRIPTION

Chemosphere is an international journal designed for the publication of original communications as well as review articles. Chemosphere, as a multidisciplinary journal, offers maximum dissemination of investigations related to all aspects of environmental science. Chemosphere will publish:

- Original communications describing important new discoveries or further developments in important fields of investigation related to the environment and human health
- Reviews, mainly of new developing areas of environmental science
- Special, themed issues on relevant topics.

The following sections and subject fields are included:

Persistent Organic Pollutants and Dioxins

This section is devoted to all scientific aspects of persistent organic pollutants, including monitoring studies in the environment, ecosystem, and people; environmental chemistry; toxicology; epidemiologic investigations; risk assessment; and processes that generate these pollutants and measures to reduce their emissions or concentrations in the environment. Organic pollutants targeted in this section can be of natural or synthetic origin but must be persistent in the environment or in organisms. Although the term "persistent" is somewhat subjective, with such definition, halogenated organic chemicals are of primary interest. Only studies that are of significance to an international audience and include a statistically representative population, sites of particular global interest, or lend themselves to interpretation at the global level should be submitted.

Environmental Chemistry

This section will publish manuscripts dealing with fundamental processes in the environment that are related to dispersion, degradation and alteration of inorganic and organic contaminants of environmental concern focussed on the dynamics of contaminants in environmental compartments such as water, soil/sediment, and air and their interactions with biosphere. Specific topics of interest include:

- Environmental fate studies including transport, biodegradation, bio-accumulation and/or deposition as well as atmospheric (photo)chemical processes, hydrolysis, adsorption/desorption
- Transformation and mineralisation of chemicals e.g. by bio- and photodegradation, redox processes and hydrolysis, bio-accumulation and/or deposition as well as atmospheric (photo)chemical processes, hydrolysis, adsorption/desorption
- Soil and water chemistry focussed on interaction, degradation and speciation aspects of environmental contaminants
- Novel environmental analytical methods including case studies
- Phytoremediation employing new strategies, findings or interpretations of general interest
- Development and application of environmental modelling and quantitative structure-activity relationships to study fate and environmental dynamics
- Monitoring studies presenting new strategies, report of novel contaminants, findings or interpretations of general interest for an international readership. Monitoring studies based on standard methodology, and of regional importance, are not considered. Studies dealing only with nutrients in agricultural ecosystems are not considered.

Environmental Toxicology and Risk Assessment

The Section on Environmental Toxicology and Risk Assessment covers all aspects of toxicology, i.e., the science of adverse effects of chemicals and toxic substances on living organisms including humans, and the scientific assessment of the risk that such adverse effects may occur.

Issues that would be appropriate for consideration include:

- Adverse effects of chemicals and toxic substances in environmental, aquatic and terrestrial, organisms
- Similar studies in experimental organisms (under laboratory conditions)
- Epidemiological studies on effects of chemicals in humans
- Biochemical studies related to mechanisms of adverse effects
- Toxicokinetics and metabolic studies on chemicals related to adverse effects
- Development and validation of testing methods based on living organisms or biological materials
- Biomonitoring of chemicals related to adverse effects
- Occupational chemical hazards and exposure.

Not considered are, e.g., studies which report only concentrations of chemicals in the environment, living organisms, food, other materials etc., or on techniques of remediation of environmental pollution, or on biochemical effects of chemicals non-relevant to toxicology.

Science for Environmental Technology

Closer description

- Advanced water and wastewater treatment process
- Incineration
- Remediation
- Hazardous Waste – industrial chemicals
- Green Chemistry

AUDIENCE

Environmental scientists, chemical engineers, biologists, toxicologists.

IMPACT FACTOR

2014: 3.340 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

Analytical Abstracts
 Aqualine Abstracts
 BIOSIS
 Elsevier BIOBASE
 Cambridge Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 MEDLINE®
 EMBASE
 Environmental Periodicals Bibliography
 PASCAL/CNRS
 Research Alert
 SCISEARCH
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Co-Editors-in-Chief

Jacob de Boer, VU University, Inst. for Environmental Studies (IVM), De Boelelaan 1087, 1081 HV, Amsterdam, Netherlands

Shane Snyder, University of Arizona, 1133 E. James E. Rogers Way, Harshbarger 108, Tucson, 85721-0011, Arizona, USA

Associate Editors

Environmental chemistry

Xinde Cao, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

Soil remediation, contaminant removal from water, flue gas, metal speciation, metals in soil, bioavailability and human health, arsenic, phosphate, development, application of solid waste-derived environmentally functional materials, biochar, recycling, groundwater

Ian Cousins, Stockholms Universitet, Stockholm, Sweden

Modelling, PFCs, levels, trends, bioaccumulation, biomonitoring, exposure assessment

Jacob de Boer, VU University, Amsterdam, Netherlands

Non-dl-POPs, FRs, levels, trends, analytical methods, food chain accumulation, interlab studies, biomonitoring, fate, exposure, fish, shellfish toxins

Ralf Ebinghaus, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Geesthacht, Germany

PM2.5, air pollution, organic and inorganic contaminants, mercury, POPs, emerging contaminants, marine environment, polar environment, atmosphere

Klaus Kümmerer, Leuphana Universität Lüneburg, Lüneburg, Germany

Sources and fate of organic chemicals in the aquatic environment including waste water, especially pharmaceuticals, pesticides, QSARs, chemoinformatics, green chemistry, sustainable chemistry, sustainable pharmacy

Martine Leermakers, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Bruxelles, Belgium

Trace metals, organometals, metalloids, radionuclides, analytical techniques, geochemical cycling, metals and human health, gel diffusion techniques, for in situ trace metal speciation DGT (diffusive gradients in thin films) and DET (diffusive equilibrium in thin films), mining

Keith Maruya, Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa, California, USA

Sources, fate, effects of emerging contaminants, natural organohalogenes, aquatic ecosystems, bioanalytical tools, passive samplers, POPs, HOCs, contaminated sediments, recycled water

Myrto Petreas, California Environmental Protection Agency, Berkeley, California, USA

Levels, trends, dl-POPs, BFRs, analytical methods, bioaccumulation, biomonitoring, exposure assessment, emission, production, generation

Andreas Sjödin, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA

Human health, analytical methods, dl- and non-dl-POPs

Gang Yu, Tsinghua University, Beijing, China

DI-POPs, levels, trends, analytical methods, bioaccumulation, monitoring, air

Toxicology and Risk Assessment

Tamara Galloway, University of Exeter, Exeter, England, UK

Nanopolymers and nanocomposites, microplastics as marine pollutants, ecotoxicology, adaptation, oil fracking and drilling, human biomonitoring

Andreas Gies, Federal Environment Agency, Berlin, Germany

Bioassays, human biomonitoring, ecotoxicology, epidemiology, indoor air, oil fracking and drilling

James Lazorchak, National Exposure Research Laboratory, Cincinnati, Ohio, USA

Effect of EDCs on fish populations, estrogenicity of WWTP discharge, gene expression, toxicity effects on a population, invasive toxic algae DNA and protein adducts, impact of coal, mineral, gas and oil extraction, pharmaceuticals, water quality criteria

Frederic Leusch, Griffith University, Southport, Queensland, Australia

Endocrine disruptors, hormones, pharmaceuticals, personal care products, in vitro assays, water quality, recycled water, omics, phytotoxicity

David Volz, University of California at Riverside, Riverside, California, USA

Fish toxicology; hepatotoxicity; cardiovascular toxicity; neurotoxicity; early life-stage toxicity; pesticides; high-volume chemicals; flame retardants; chemicals policy and regulation; human and ecological risk assessment; high-throughput screening; mechanistic toxicology;

Technology

Enric Brillas, University of Barcelona, Barcelona, Spain Non-dl-POPs, FRs, levels, trends, analytical methods, food chain accumulation, interlab studies, biomonitoring, fate, exposure, fish, shellfish toxins.

Jörg Drewes, Technische Universität München, Garching, Germany Energy efficient water and wastewater treatment, energy recovery from waste streams, distributed water reuse, potable reuse; monitoring design for natural treatment systems (riverbank filtration, aquifer

recharge and recovery), characterization of natural and effluent organic matter emerging organic chemicals (endocrine disrupting compounds, pharmaceutical residues, household chemicals) in natural and engineered systems

Jun Huang, Tsinghua University, Beijing, China DAOP (advanced oxidation process), photolysis/photocatalysis, mechanochemical destruction (MCD), alternative to POPs, PPCPs removal

Min Jang, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia Water treatment, nanotechnology, geochemistry, drinking water, adsorption, oxidation, ultrasound, mine reclamation

Hyunook Kim, University of Seoul, Dongdaemun-Gu, Seoul, South Korea Biological removal of organic compounds, nutrient removal, analysis and degradation of trace organics, odorants from water/wastewater

Yu Liu, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore Anaerobic degradation, nutrient recovery

Shane Snyder, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA Drinking water, hydraulic fracturing, produced water, water treatment processes (particularly advanced oxidation), use of cellular bioassays for characterizing complex mixtures of contaminants

Chang-Ping Yu, Chinese Academy of Sciences (CAS), Xiamen, China Water and wastewater treatment, contaminant removal (from water, soil and flue gas), including remediation (no absorption), nano, nutrient recovery, sludge management, technologies for recycle/ reuse e.g., of microbial fuel cell techniques, gasification/pyrolysis for biomass-to-energy, bio-and phytoremediation, biochar amended soil to bind e.g. herbicides

Xiangru Zhang, Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong, China Water treatment, drinking water, emerging compounds, disinfection byproducts

Editorial Board

Joan Albaigés, Barcelona, Spain organic geochemistry, persistent organic pollutants, oil pollution, organic pollution monitoring

Mari Asami, Saitama, Japan

Henk Bouwman, Potchefstroom, South Africa

Heechul Choi, Gwangju, South Korea

Bella Chu, College Station, Texas, USA Biodegradation, Bioremediation, Endocrine-disrupting compounds, Emerging contaminants, Bioenergy and value-added products.

Simonetta Corsolini, Siena, Italy

Teresa J. Cutright, Akron, Ohio, USA

Cynthia de Wit, Stockholm, Sweden

Shinya Echigo, Kyoto, Japan

Loretta Fernandez, Boston, Massachusetts, USA

Heidelore Fiedler, Örebro, Sweden

Tom Harner, Toronto, Ontario, Canada

Persistent Organic Pollutants and their environmental fate, transport and passive sampling methods

Joop Hermens, Utrecht, Netherlands

Ron Hoogenboom, Wageningen, Netherlands

dioxins, PCBs, transfer, bioassay, PFASs, analysis, risk assessment, exposure assessment
Jianying Hu, Beijing, China

Gwenaél Imfeld, Strasbourg, France

Bjorn Jenssen, Trondheim, Norway

Susan Jobling, Uxbridge, England, UK

Roland Kallenborn, Aas, Norway

Jong Seong Khim, Seoul, South Korea

Vincent Kramer, Indianapolis, Indiana, USA

Jussi Kukkonen, Joensuu, Finland

Marja Lamoree, Amsterdam, Netherlands

Pim Leonards, Amsterdam, Netherlands

Domen Lestan, Ljubljana, Slovenia

Xingfang Li, Edmonton, Alberta, Canada

Keywords: HPLC-MS, water disinfection byproducts, toxicology

Yongmei Li, Shanghai, China

Heng Liang, Harbin, China

Membrane Technology

Tsair-Fuh Lin, Tainan, Taiwan, ROC

identification, treatment, and process modeling relevant to cyanobacteria, taste and odor compounds and cyanotoxins present in reservoirs and water treatment plants; monitoring and treatment of arsenic and chlorinated hydrocarbons in ground water

Gunilla Lindström, Örebro, Sweden

Lena Ma, Gainesville, Florida, USA trace metal; soil chemistry; phytoremediation; bioavailability; hyperaccumulation.

Xiang-Zhou Meng, Shanghai, China persistent organic pollutants; wastewater; sewage sludge; soil; occurrence; fate; risk assessment

Hyo-Bang Moon, Ansan, South Korea

Persistent organic pollutant (POPs), Emerging contaminants, Environmental fate, Human exposure

Jochen Mueller, Brisbane, Queensland, Australia

Junfeng Niu, Beijing, China

Pongsak Noophan, Bangkok, Thailand

Gerhard Rimkus, Hamburg, Germany

Synthetic fragrances and personal care products in the environment; Bioaccumulation and metabolism in biota like fish, seals, birds etc.; Bioaccumulation in human tissue/breast milk; Analysis of contaminants in biota and food samples; Residues and contaminants in food, EU food legislation.

Josep Rivera, Barcelona, Spain

Paolo Roccaro, Catania, Italy

Stephen Safe, College Station, Texas, USA

Reyes Sierra-Alvarez, Tucson, USA

Werner Tirler, Bolzano, Italy

Katrin Vorkamp, Roskilde, Denmark

Fate of organic pollutants in the environment; Persistent organic pollutants in the Arctic; New contaminants (e.g. brominated flame retardants); Analytical methods in complex matrices

Jana Weiss, Stockholm, Sweden

analytical chemistry, human exposure, non-target screening, effect-directed analysis

Yu (Frank) Yang, Reno, Nevada, USA

the biogeochemical cycles of carbon/nitrogen, the reductive degradation of emergent organohalide, fate and transport of engineering nano-materials in agricultural ecosystem and recover of energy/ nutrient from wastewater.

Zeyu Yang, Ottawa, Canada

Yeomin Yoon, Columbia, South Carolina, USA

Water Treatment; Micropollutants; Membrane Filtration; Adsorption

Eddy Zeng, Guangzhou, China persistent organic pollutants; bioaccumulation; human exposure; health risk assessment; intercompartmental diffusion flux; passive sampling; wet and dry deposition

Minghui Zheng, Beijing, China

Persistent Organic Pollutants, Dioxins, Incineration, POPs Emission, POPs Monitoring

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.

INTRODUCTION

Submission of Papers

All manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/chem>.

During submission papers should be marked for the attention of a subject Editor or the relevant section, if possible. Failure to provide this information will significantly delay processing of the manuscript.

Types of article

Chemosphere accepts Research Papers, Review Papers, Short Communications, Letters to the Editor, Replies and Discussion Papers. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication.

A Short Communication should be of significant scientific merit (a novel finding that warrants immediate publication).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further

information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

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 <http://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 <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

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: <http://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 <http://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 <http://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 <http://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 <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://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 <http://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.

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 <http://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 (<http://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 2750, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://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 24 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

With the submitted manuscript authors are requested to provide full contact details of six potential reviewers including institutional email addresses ONLY (No yahoo, gmail, Hotmail.com address, etc.). The suggested reviewers should not be from the same institution as the author, Chemosphere Editors or Editorial Board members. Not more than two should come from the same country as the author. It should also be avoided to suggest referees that are living in a different country but have the same nationality as the author.

PREPARATION

NEW SUBMISSION

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. It would be very helpful to the Editors if you provide your highlights in this document. As with any new submission, YPYW requires continuous line numbering.

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 has consecutive line numbering - 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.

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: <http://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

Please see our [Important instructions for Authors submitting to The Science of Environmental Toxicology Section](#)

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.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

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 lowercase 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

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

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 <http://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 <http://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.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

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

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: <http://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) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or

online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://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.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

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/chemosphere>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins 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: **AI** citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

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-ltwa/>.

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

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 <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Interactive plots This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <http://www.elsevier.com/interactiveplots>.

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

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 Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Line Numbers: To facilitate the review process continuous line numbers should be inserted in the text of the manuscript.

Paper Length: The Editors generally encourage brevity for all Research Papers. Short Communications should not exceed 2000 words and will be given priority for rapid publication. Research papers should not exceed 6500 words. Review papers should not exceed 9000 words. Word counts include text, references, figures and tables. Each figure or table should be considered equal to 300 words. The number of figures and/or tables should not exceed a total amount of seven. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections.

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](#). 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>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

