



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

THIERRY WESLEY DE ALBUQUERQUE AGUIAR

**AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra*
CONTENDO A LECTINA BmoLL SOBRE *Biomphalaria glabrata*, CERCÁRIAS DE
Schistosoma mansoni E MONITORAMENTO AMBIENTAL
COM *Danio rerio***

Recife
2022

THIERRY WESLEY DE ALBUQUERQUE AGUIAR

**AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra*
CONTENDO A LECTINA BmoLL SOBRE *Biomphalaria glabrata*, CERCÁRIAS DE
Schistosoma mansoni E MONITORAMENTO AMBIENTAL
COM *Danio rerio***

Dissertação apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Profa. Ph.D. Luana Cassandra B. Barroso Coelho

Coorientador: Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife

2022

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Aguiar, Thierry Wesley de Albuquerque.

Avaliação de preparações de folhas de Bauhinia monandra contendo a lectina BmoLL sobre Biomphalaria glabrata, cercárias de Schistosoma mansoni e monitoramento ambiental com Danio rerio / Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar. - Recife, 2022.
93f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2022.

Orientação: Luana Cassandra B. Barroso Coelho.

Coorientação: Hallysson Douglas Andrade de Araújo.

Inclui referências e anexos.

1. Efeito embriotóxico; 2. Esquistossomose mansônica; 3. Potencial moluscicida; 4. Lectina; 5. Ecotoxicidade. I. Coelho, Luana Cassandra B. Barroso. II. Araújo, Hallysson Douglas Andrade de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

THIERRY WESLEY DE ALBUQUERQUE AGUIAR

AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES DE FOLHAS DE *Bauhinia monand*

***ra* CONTENDO A LECTINA BmoLL SOBRE *Biomphalaria glabrata*, CERCÁRIAS DE
Schistosoma mansoni E MONITORAMENTO AMBIENTAL
COM *Danio rerio***

Dissertação apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

APROVADO EM: 16/11/2022

Banca Examinadora:

Profa. Ph.D. Luana Cassandra B. Barroso Coelho (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. José Guedes da Silva Junior (Membro Externo)
Centro Universitário Mauricio de Nassau, Campina Grande

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À Deus,
Minha família e amigos que nunca permitiram eu
sequer pensar em desistir,
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois sem ele nada é possível.

A minha família por todo apoio durante a minha vida, definindo a pessoa que sou hoje.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho que confiou a mim esse brilhantíssimo projeto.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. André de Lima Aires e Dr. Hallysson Douglas de Andrade Araújo pelas orientações, paciência e amizade, além de todo suporte durante os experimentos e auxílio durante a escrita do artigo e da dissertação.

A Prof^a. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo e a todos colaboradores do departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE que foram essenciais tanto em fornecer estrutura quanto aprendizado para os experimentos.

Aos meus grandes amigos João Ritinto, José Josenildo e Ricardo que me ajudaram nos experimentos e disciplinas do mestrado. Muito obrigado!

A todos os colegas, amigos e parceiros de laboratório, Sávio Silas, Wilza Wanessa, Letícia da Silva e Kaio Freitas.

Aos membros do grupo “Os Brincantes”, João Lucas e João Mota, por sempre estarem ali fazendo a dificuldade ser mais um momento de riso.

E a CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro ao projeto.

O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes,
não tivesse tentado o impossível.
Max Weber

RESUMO

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* spp. No Brasil, *Biomphalaria glabrata* é o hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* e a *Bauhinia monandra*, que suas folhas contêm lectina BmoLL com ação biocida, é uma planta amplamente encontradas regiões endêmicas para a esquistossomose mansoni, incluindo no Brasil. A pesquisa por substâncias naturais com potencial moluscicida, cercarecida e que não apresentem impacto no meio ambiente, é de extrema relevância para o controle da transmissão do *S. mansoni*. Neste sentido, o presente estudo reporta pela primeira vez a composição fitoquímica, por HPLC, de preparações de *B. monandra* e o seu efeito sobre embriões e adultos de *B. glabrata*, através dos parâmetros de reprodução e mortalidade e citotoxicidade sobre hemócitos e genotoxicidade após exposição em concentrações subletais. Além disso, da toxicidade sobre cercárias de *S. mansoni* e monitoramento ambiental com *Artemia salina* e *Danio rerio*. O extrato salino foi obtido do pó de folhas de *B. monandra* em tampão citrato-fosfato contendo NaCl 0,15 M e a fração através de sulfato de amônio (60%) adicionado ao extrato para precipitar as proteínas. Os metabólitos secundários foram investigados por cromatografia de camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (HPLC); proteína quantitativa, atividade hemaglutinante (AH) e AH específicos (AHE) foram avaliados. Embriões de *B. glabrata* em blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage* (300 de cada) foram expostos por 24 h em diferentes concentrações (0,125-0,6 mg/mL). Com adultos, parâmetros reprodutivos (fecundidade e fertilidade) e sobrevivência (sete dias após exposição), bem como a citotoxicidade e genotoxicidade foram analisados. Além disso, os efeitos cercarecida e segurança ambiental utilizando *A. salina* foram realizados. O extrato salino e fração de *B. monandra* apresentou derivados cinâmicos, flavonóides e saponinas por HPLC. Após 24h de exposição, o extrato salino e a fração foram tóxicos para embriões em estágio de blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage* (Concentração Letais [CL₉₀] de 0,155 e 0,168; 0,161 e 0,157; 0,398 e 0,379; 0,573 e 0,368; 0,592 e 0,548 mg/mL, respectivamente) e para caramujos adultos (CL₉₀ de 9,47 e 1,70 mg/mL, respectivamente) com redução da deposição de ovos. Na análise de hemócitos o extrato e fração alteraram a morfologia, caracterizada por células em apoptose, micronúcleo e binucleação, enquanto para a análise da fragmentação do DNA evidenciamos danos significativos quando comparados ao controle. O extrato causou alteração na motilidade das cercárias, porém, foi tóxico para *A. salina*, enquanto a fração foi letal para cercárias e foi tóxico para *A. salina*. Os resultados destacam que o extrato e a fração

de *B. monandra* são promissores no controle à esquistossomose, uma vez mostrou toxicidade contra o hospedeiro intermediário, cercarias de *S. mansoni* e segurança ambiental.

Palavras-chaves: Efeito embriotóxico, Esquistossomose mansônica, Potencial Moluscicida, Lectina, Ecotoxicidade.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an infectious parasitic disease caused by trematode worms of the genus *Schistosoma* spp. In Brazil, *Biomphalaria glabrata* is the intermediate host of *Schistosoma mansoni* and *Bauhinia monandra*, whose leaves contain BmoLL lectin with biocidal action, is a plant widely found in endemic regions for schistosomiasis mansoni, including Brazil. The search for natural substances with molluscicidal potential, which are fenced and do not have an impact on the environment, is extremely important for controlling the transmission of *S. mansoni*. In this sense, the present study reports for the first time the phytochemical composition, by HPLC, of preparations of *B. monandra* and its effect on embryos and adults of *B. glabrata*, through reproduction and mortality parameters and cytotoxicity on hemocytes and genotoxicity after exposure at sublethal concentrations. In addition, toxicity on *S. mansoni* cercariae and environmental monitoring with *Artemia salina* and *Danio rerio*. The saline extract was obtained from the powder of *B. monandra* leaves in citrate-phosphate buffer containing 0.15 M NaCl and the fraction through ammonium sulfate (60%) added to the extract to precipitate the proteins. Minor metabolites were investigated by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid (HPLC); Quantitative protein, hemagglutinating activity (HA) and specific HA (SHA) were evaluated. *B. glabrata* embryos in blastula, gastrula, trochophora, veliger and hippo stage (300 of each) were exposed for 24 h at different concentrations (0.125-0.6 mg/mL). With adults, reproductive parameters (fecundity and fertility) and survival (seven days after exposure) as well as cytotoxicity and genotoxicity were analyzed. In addition, the fenced effects and environmental safety using *A. salina* were performed. The saline extract and fraction of *B. monandra* showed cinnamic derivatives, flavonoids and saponins by HPLC. After 24h of exposure, the saline extract and fraction were toxic to blastula, gastrula, trochophora, veliger and hippo stage embryos (Lethal Concentration [CL₉₀] of 0.155 and 0.168; 0.161 and 0.157; 0.398 and 0.379; 0.573 and 0.368; 0.592 and 0.548 mg/mL, respectively) and for adult snails (CL₉₀ of 9.47 and 1.70 mg/mL, respectively) with reduced egg deposition. In the analysis of hemocytes, the extract and fraction altered the morphology, characterized by cells in apoptosis, micronucleus and binucleation, while for the analysis of DNA fragmentation, we showed significant damage when compared to the control. The extract caused changes in the cercariae motility, however, it was toxic for *A. salina*, while the fraction was lethal for cercariae and was toxic for *A. salina*. The results highlight that the

extract and the fraction of *B. monandra* are promising in the control of schistosomiasis, since it showed toxicity against the intermediate host, cercariae of *S. mansoni* and environmental safety.

Keywords: Embryotoxic effect, Schistosomiasis mansoni, Molluscicidal Potential, Lectin, Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição geográfica das espécies de <i>Schistosoma</i> no mundo	16
Figura 2 –	Distribuição global da esquistossomose	17
Figura 3 –	Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil	18
Figura 4 –	Principais municípios para controle da esquistossomose	18
Figura 5 –	Distribuição espacial dos criadouros e quantidade de nos focos potenciais encontrados nos bairros do Recife (2016-2017). Distribuição dos criadouros (A); Kernel (KDE) representação dos criadouros (B); Kernel (KDE) representação de focos potenciais (C); e Kernel (KDE) representação do número de caracóis por criadouro (D)	20
Figura 6 –	Estágios de desenvolvimento do <i>S. mansoni</i>	21
Figura 7 –	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 8 –	Distribuição espacial das espécies no Brasil e morfologia das conchas de (A e D) <i>Biomphalaria glabrata</i> , (B e E) <i>Biomphalaria straminea</i> e (C e F) <i>Biomphalaria tenagophila</i>	23
Figura 9 –	Caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	24
Figura 10 –	Diferentes estádios embrionários de <i>Biomphalaria glabrata</i> , sendo (A) Blástula, (B) Gástrula, (C) Trocófora, (D) Véliger e (E) Hippo stage	26
Figura 11 –	Diferença morfológica entre hemócitos (A) Granulócito e (B) Hialinócito de <i>Biomphalaria glabrata</i>	28
Figura 12 –	Aspectos físicos característicos da <i>Bauhinia monandra</i> Kurz, sendo (A) Flores, (B) Vagem e (C) Folhas	31
Figura 13 –	Morfologia da <i>Artemia salina</i>	34
Figura 14 –	Ciclo de vida da <i>Artemia Salina</i>	35
Figura 15 –	<i>Danio rerio</i> (Peixe-zebra)	37
Figura 16 –	Ciclo de vida do <i>Danio rerio</i>	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE	16
2.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Schistosoma mansoni</i>	20
2.3 GÊNERO <i>Biomphalaria</i>	22
2.3.1 <i>Biomphalaria glabrata</i>	24
2.3.2 Características da hemolinfa de <i>B. glabrata</i>	27
2.4 NICLOSAMIDA	28
2.5 GÊNERO <i>Bauhinia</i>	30
2.5.1 <i>Bauhinia monandra</i>	30
2.6 LECTINAS DE PLANTAS	32
2.7 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	33
2.7.1 <i>Artemia salina</i>	33
2.7.2 <i>Danio rerio</i>	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivo específico	39
4 REFERÊNCIAS	40
5 ARTIGO - EFFECT OF <i>Bauhinia monandra</i> KURZ LEAF PREPARATIONS ON EMBRYONIC STAGES AND ADULT SNAILS OF <i>Biomphalaria glabrata</i> (SAY, 1818), <i>Schistosoma mansoni</i> CERCARIAE AND TOXICITY IN <i>Artemia salina</i>	69
6 CONCLUSÕES	89
ANEXO A - RESUMOS ENVIADOS PARA EVENTOS CIENTÍFICOS	90
ANEXO B – PREMIAÇÃO	92
ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO	93

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária negligenciada, causada por helmintos do gênero *Schistosoma* spp. prevalentes em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais onde existem mais de 240 milhões de pessoas infectadas e outras 800 milhões vivendo em risco permanente de infecção (WHO, 2022). No Brasil, a única espécie presente é o *S. mansoni* com estimativa entre 1,5 milhões de infectados e Pernambuco é um dos Estados, entre os 19 endêmicos, com maior taxa de prevalência e incidência, especialmente na Zona da Mata e mais recentemente importante expansão para a Região Litorânea e a Região Metropolitana do Recife. Ainda em Pernambuco, o Estado apresenta elevada taxa de internação hospitalar e a maior taxa de mortalidade por esquistossomose, uma média cinco vezes superior a nacional (Pernambuco, 2014; Barbosa et al., 2016). A infecção é prevalente em 102 (55%) dos 185 municípios pernambucanos e todos os anos milhares de pessoas são diagnosticadas com a doença (Barreto et al., 2015; Facchini et al., 2018).

A transmissão do *S. mansoni* depende do contato humano com coleções hídricas onde habitam caramujos infectados - hospedeiros intermediários do parasito, que diariamente liberam milhares de cercárias, forma infecciosa do *S. mansoni* para o homem - hospedeiro definitivo. No Brasil as espécies vetores são caramujos do gênero *Biomphalaria* sendo o *B. glabrata* o principal vetor, especialmente na Região Nordeste e grande disseminação na faixa litorânea brasileira (Scholte, et al., 2012). Em Pernambuco, há áreas em que a positividade para caramujos *B. glabrata* eliminando cercárias de *S. mansoni* chega acima de 80% (Barbosa et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o controle dos hospedeiros intermediários através do uso de moluscicida (WHO, 2017). A niclosamida (Baylucide, Bayer®) é o moluscicida recomendado pela OMS, apenas em condições de uso em localidades que apresentam alta prevalência da esquistossomose, devido à sua elevada toxicidade para espécies não-alvo, como peixes, plantas e diversos organismos presentes no ecossistema aquático (Oliveira-Filho; Paumgarten, 2000; WHO, 2017).

Assim, há uma urgente necessidade de investimento em pesquisas que possam contribuir com novas alternativas moluscicidas com ação eficaz, biossegura, alta seletividade, baixo custo e de fácil aplicação (King; Bertsch, 2015). Esse cenário encoraja nosso Grupo de Pesquisa por produtos naturais bioativos no controle dos embriões e caramujos adultos de *B. glabrata*, agente infeccioso (cercárias de *S. mansoni*) e avaliação da ecotoxicidade ambiental com bioindicadores de referência desses produtos (Albuquerque et al., 2014; Rocha-Filho et al., 2015; Araújo et al; 2018a,b; Araújo et al., 2019; Santana et al., 2020).

Diversos estudos exploram a atividade moluscicida de origem natural (Albuquerque et al., 2014; Rocha-Filho et al., 2015; Araújo et al., 2018a,b; Santana et al., 2020). Neste sentido as plantas do gênero *Bauhinia* (Família das Fabaceae) são amplamente encontradas nos continentes onde é relatada endêmicidade para a esquistossomose, tais como na África, Ásia, bem como América Central e do Sul (Nworie; Okorie, 2018). No Brasil, a *B. monandra* é conhecida popularmente como "pata-de-vaca" e diversas aplicações biotecnológicas para as folhas e isolados já foram reportadas (Cagliari et al., 2018; Oliveira et al., 2020), por exemplo, uma lectina, proteína que se liga ao carboidrato galactose, por reconhecimento específico e reversível, foi purificada à homogeneidade das folhas (BmoLL, *B. monandra* Leaf Lectin) de *B. monandra* e apresentou atividade inseticida sobre *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Coelho; Silva, 2000; Macedo et al., 2007). Além disso, outros resultados promissores foram observados com endofíticos isolados das folhas da *B. monandra*, sendo reportadas ações fungicida e bactericida (Ramos et al., 2016; Araujo-Melo et al., 2017). Em relação ao parâmetro de toxicidade utilizando o modelo bioindicador ambiental *Artemia salina* a BmoLL não afetou a sobrevivência de nauplios, nem mesmo em elevadas concentrações de 250-1.000 µg/mL (Araújo et al., 2019).

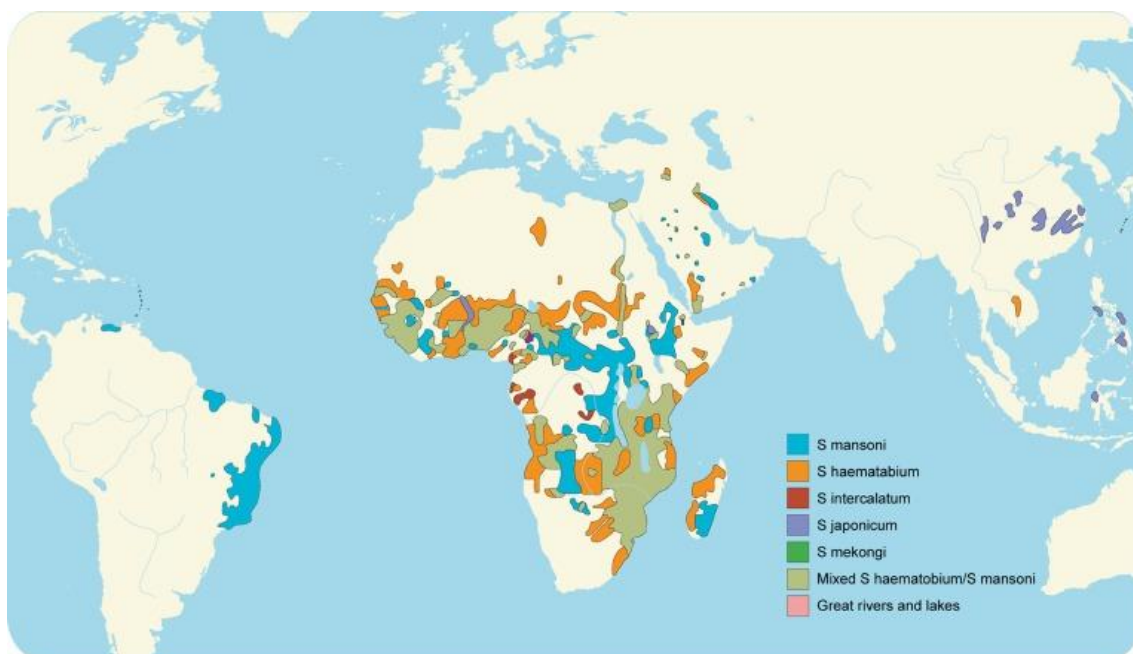
Apesar dos derivados de folhas de *B. monandra* apresentarem atividades biocidas promissoras no controle populacional de pragas ou micro-organismos indesejáveis, ainda não há estudos que reportem a toxicidade de extratos e frações de folhas contendo a lectina BmoLL no controle populacional de caramujos de *B. glabrata*, agente infeccioso da esquistossomose mansônica e sobre *Danio rerio* (bioindicador de toxicidade ambiental). Assim, nosso objetivo foi determinar a composição fitoquímica de extrato salino e fração de folhas de *B. monandra* e a toxicidade do sobre embriões e adultos *B. glabrata*, através da mortalidade e alterações na fecundidade e fertilidade, além da citotoxicidade sobre hemócitos e genotoxicidade em adultos expostos em concentrações subletais. Ademais, avaliar a atividade cercaricida contra *S. mansoni* e o monitoramento ambiental nos modelos de *Artemia salina* e *Danio rerio*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

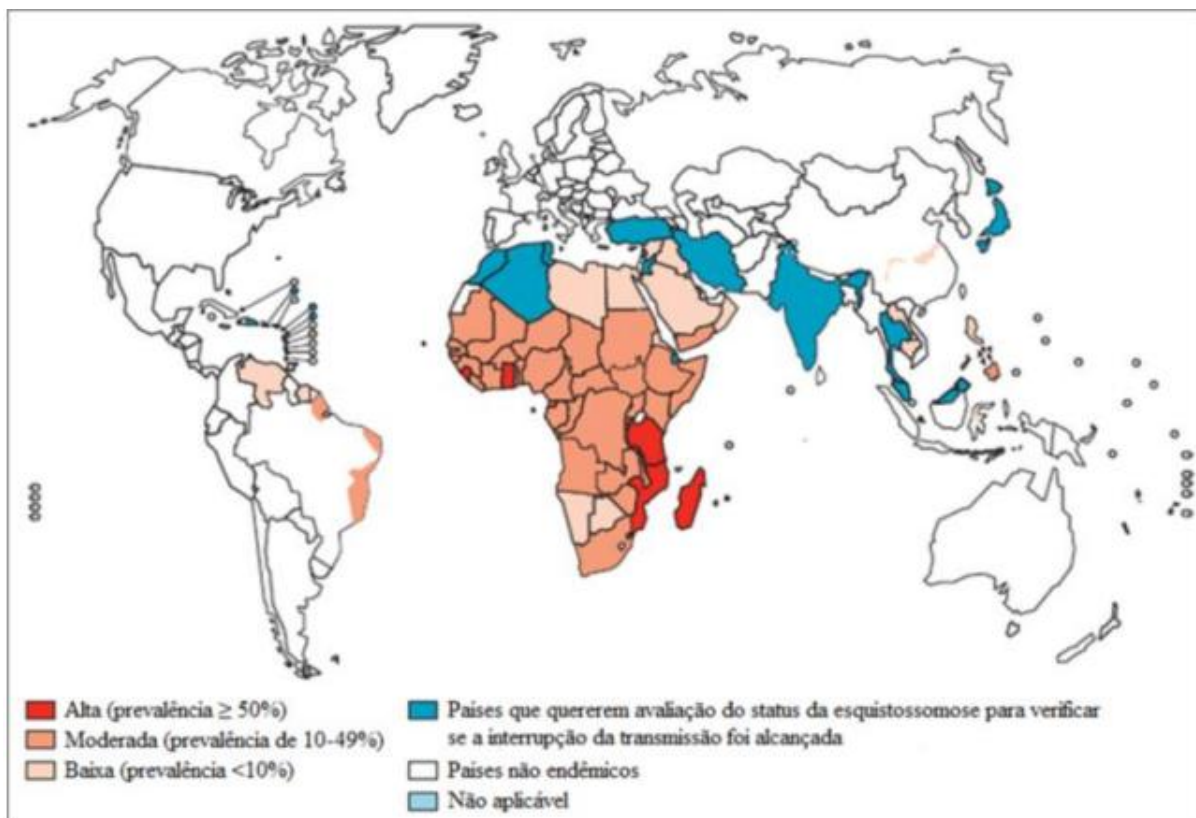
A esquistossomose é causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* spp., há cinco espécies com importância na saúde pública, são elas: *S. mekongi*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni*. Sendo as três últimas espécies os agentes etiológicos com grande importância epidemiológica e possuem distribuição geográfica diferentes entre si (BLANTON, 2019; REY et al., 2021). Na África, há a prevalência *S. mansoni*, enquanto essa é a única espécie presente nas Américas Central e Sul, destacando-se no Caribe, Venezuela e Brasil (NOYA et al., 2015), sendo assim, a espécie mais prevalente no mundo (Figura 1). A esquistossomose é uma doença negligenciada de grande importância na saúde pública, sendo endêmica em 78 países e territórios concentrada em regiões tropicais e subtropicais (Figura 2), uma vez que no mundo aproximadamente 240 milhões de pessoas encontram-se infectadas, colocar em risco de infecção outras 800 milhões de forma permanente e é causa de 200.000 óbitos todos os anos (WHO, 2022).

Figura 1 – Distribuição geográfica das espécies de *Schistosoma* no mundo.



Fonte: Shaker et al., 2014.

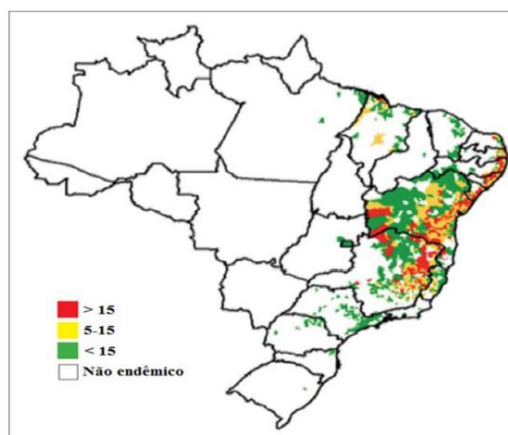
Figura 2 – Distribuição global da esquistossomose



Fonte: Bustinduy et al. (2014).

No Brasil, a esquistossomose é notificada em 19 dos 27 Estados, com elevada prevalência no Sudeste e Nordeste, onde cerca de 1,5 milhões de infectados e põe em risco outras 25 milhões (KATZ, 2018), endêmica na maioria dos estados da Região Nordeste (Figura 3), como Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio grande do Norte e Sergipe (BRASIL, 2014).

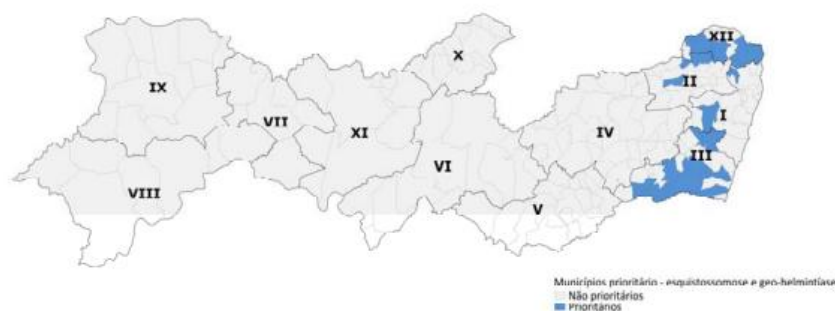
Figura 3 – Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni em território brasileiro



Fonte: Katz, 2018.

Na região nordeste, Pernambuco é o Estado com maior impacto em prevalência da doença, apresentando 1/3 dos óbitos no Brasil (PERNAMBUCO, 2017). O estado apresenta 102 municípios endêmicos, destes, 46,1% são do Agreste, 41,2% na Zona da Mata e 12,7% na Região Metropolitana do Recife (BRASIL, 2018). A infecção por *S. mansoni* é prevalente em 42 municípios que compõem a Zona da Mata e litorânea do Estado, com o município de Vitória de Santo Antão., o mais afetado (BRASIL, 2018). Segundo o programa SANAR, são 21 municípios prioritários para o controle da esquistossomose separados em 4 microrregiões (Figura 4): Geres I (Vitória de Santo Antão e Araçoiaba), II (João Alfredo, Machados e Vicência), III (Água Preta, Barreiros, Escada, Gameleira, Jaqueira, Maraial, Palmares, Primavera, Rio Formoso, São Benedito do Sul e Xexéu) e XII (Aliança, Goiana, Itaquitinga, Macaparana e Timbaúba) (SESPE, 2020).

Figura 4 – Distribuição dos municípios de Pernambuco prioritários para Esquistossomose

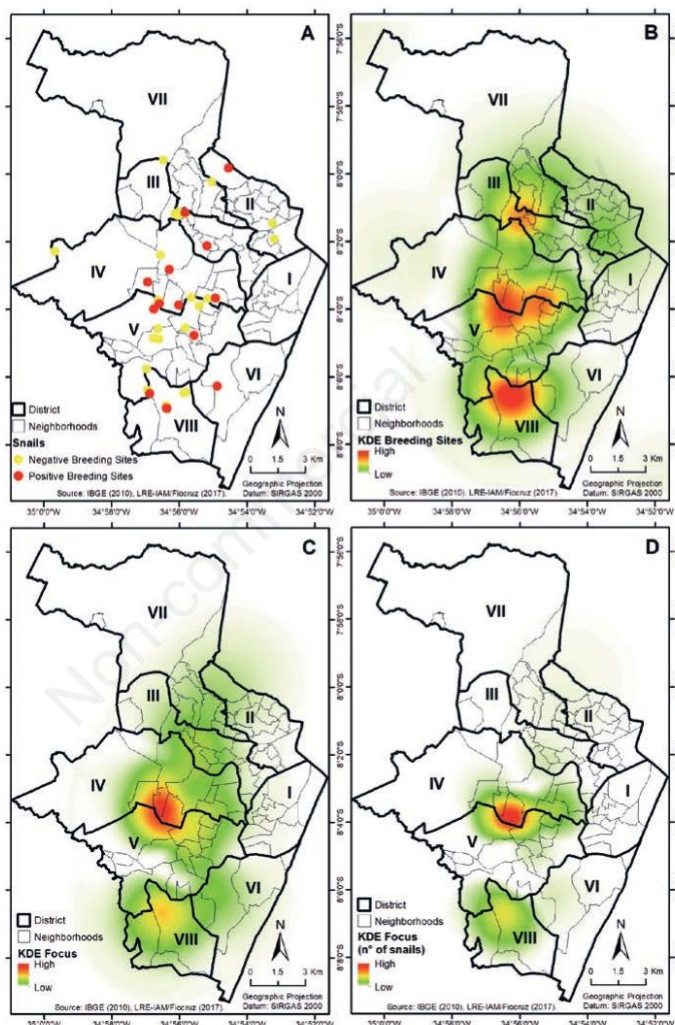


Fonte: SESPE, 2020.

De acordo com dados do Sistema de Informação Hospitalar, no período de 2008 a 2014, 473 internações realizadas enquanto no período de 1999 a 2013, ocorreram 2578 óbitos por esquistossomose e entre 1999 e 2014, foram registrados 1943 novos casos da doença em nascidos e residentes do Estado (BARBOSA et al., 2016). Em 2011, foi realizado um estudo com o município de Vitória de Santo Antão diagnosticando 425 casos da doença e além de focos com a presença do *B. glabrata* infectado pelo *S. mansoni* (GOMES, 2012).

Desde a década de 90, é relatado na literatura como a disseminação da esquistossomose na região metropolitana do Recife afeta moradores e turistas em localidades litorâneas, o que denota a falta de controle da doença no Estado (GONÇALVES et al., 1991; BARBOSA et al., 2010). Um estudo de mapeamento em Recife, realizado no período 2016-2017, demonstrou que quarenta e quatro criadouros foram identificados dos quais foram coletados 3800 caramujos, destes 14 (31,8%) foram positivos para infecção por *S. mansoni* (Figura 5) (DE OLIVEIRA et al., 2020). Esse cenário epidemiológico reforça a gravidade da doença como também o coloca como um problema de saúde persistente.

Figura 5 - Distribuição espacial dos criadouros e quantidade de nos focos potenciais encontrados nos bairros do Recife (2016-2017). Distribuição dos criadouros (A); Kernel (KDE) representação dos criadouros (B); Kernel (KDE) representação de focos potenciais (C); e Kernel (KDE) representação do número de caracóis por criadouro (D).



Fonte: De Oliveira et al., 2020.

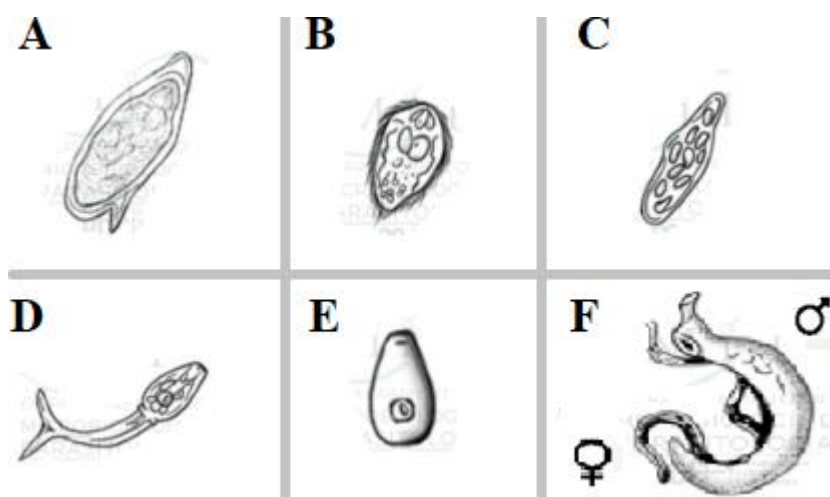
2.2 CICLO BIOLÓGICO DO *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* possui sete estágios de desenvolvimento (ovo, miracídio, esporocistos, cercarias, esquistossômulo, vermes jovens (transição) e vermes adultos (macho e fêmea) necessitando de um hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*), e outro definitivo (mamíferos/homem) para completar seu ciclo de vida. No homem, após 38 dias de infecção, os vermes jovens amadurecem e tornam-se adultos (Fig. 6F) em vasos intra-hepáticos, local em que ocorre o acasalamento. Os casais migram para as veias mesentéricas e a fêmea inicia a oviposição em veias menos calibradas do intestino com cerca de 300/400 ovos/dia

(SOUZA et al., 2011). Em 45 dias de infecção, parte dos ovos (Fig. 6A) são embolizados dos vasos mesentéricos para o baço e fígado, enquanto o restante atravessa o epitélio intestinal e são eliminados nas fezes (COLLEY et al., 2014; ABE et al., 2018; CHUAH et al., 2019).

Em meio aquático, as fezes são dissolvidas e os ovos maduros dão continuidade ao ciclo quando o miracídio (Fig. 6B), larva ciliada de vida livre, rompe e eclode do ovo (KAMEL et al., 2021). O miracídio nada e penetra ativamente no caramujo *Biomphalaria*. Interno ao caramujo, o miracídio se desenvolve em esporocisto (Fig. 6C) primário, migra para o hepatopâncreas e/ou ovotesti, se multiplica assexuadamente e origina o esporocisto secundário que por sua vez, sofre diversas alterações morfofisiológicas e assexuadamente conclui seu desenvolvimento em cercárias (Fig 6D), larvas com cauda bifurcada que, sobre estímulos luminosos e temperatura são liberadas em meio aquático e possuem a capacidade de nadar e penetrar a pele humana (BRASILEIRO FILHO, 2016; MOUAHID et al., 2018; MCMANUS et al., 2020). Após penetração, as cercárias perdem sua cauda e tornam-se esquistossômulo (Fig 6E) de pele (MAGUIRE, 2015; BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2019;), logo, migram através vasos sanguíneos ou linfáticos para os pulmões, depois alcança o coração e alojam-se no sistema porta-venosa, desenvolvendo em vermes jovem (COLLEY; SECOR, 2014; SCHWARTZ; FALLON, 2018; NATION et al., 2020).

Figura 6 – Estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*. Sendo (A) Ovo, (B) Miracídio, (C) Esporocisto, (D) Cercaria, (E) Esquistossômulo e (F) Vermes Macho e Fêmea.

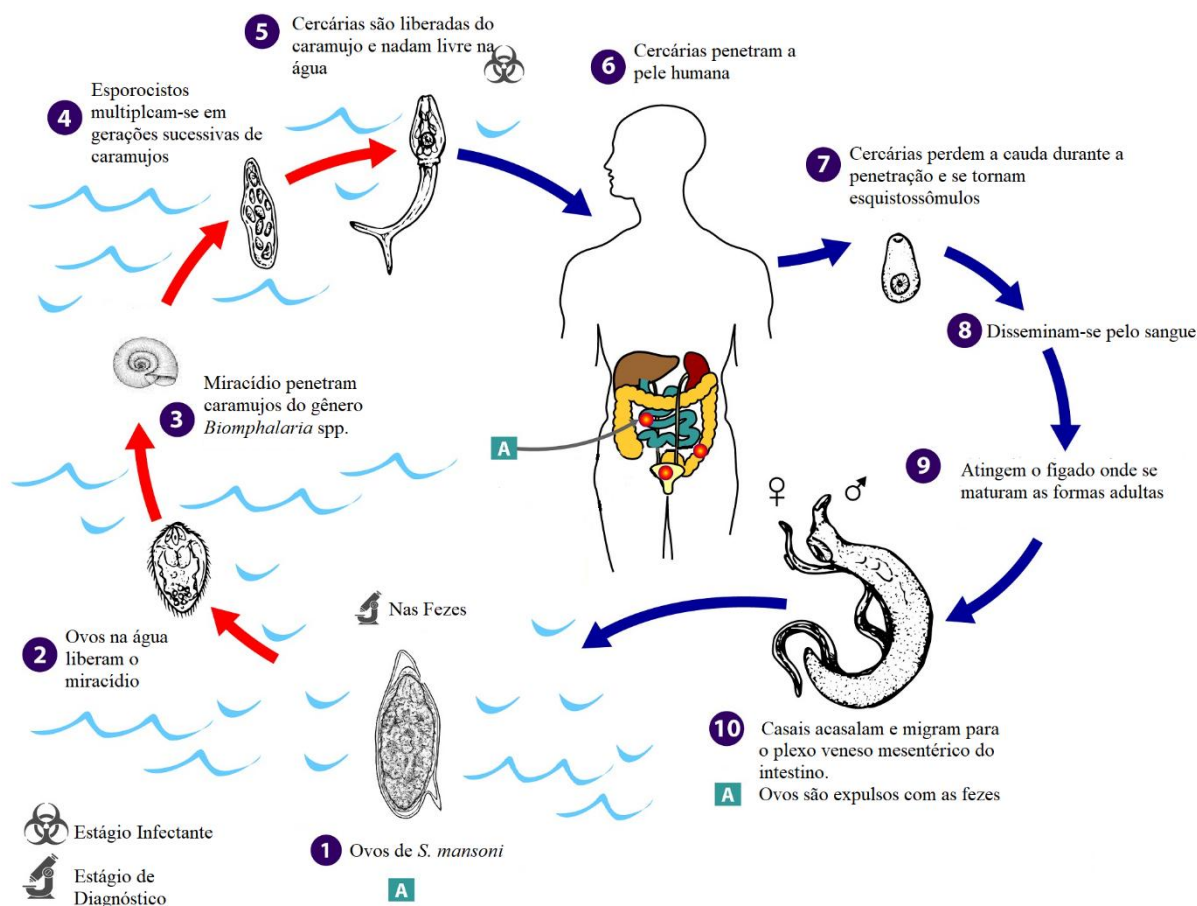


Fonte: Adaptado de Coelho (2021)

No fígado, o verme alcança desenvolvimento em adultos, verme macho e fêmea acasalam e completam maturidade sexual, migram para os vasos mesentéricos superiores e

iniciam a oviposição, reiniciando o ciclo de vida (Figura 6) (SOUZA et al., 2011; PILA et al., 2017; CASTILHO et al., 2019).

Figura 7 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



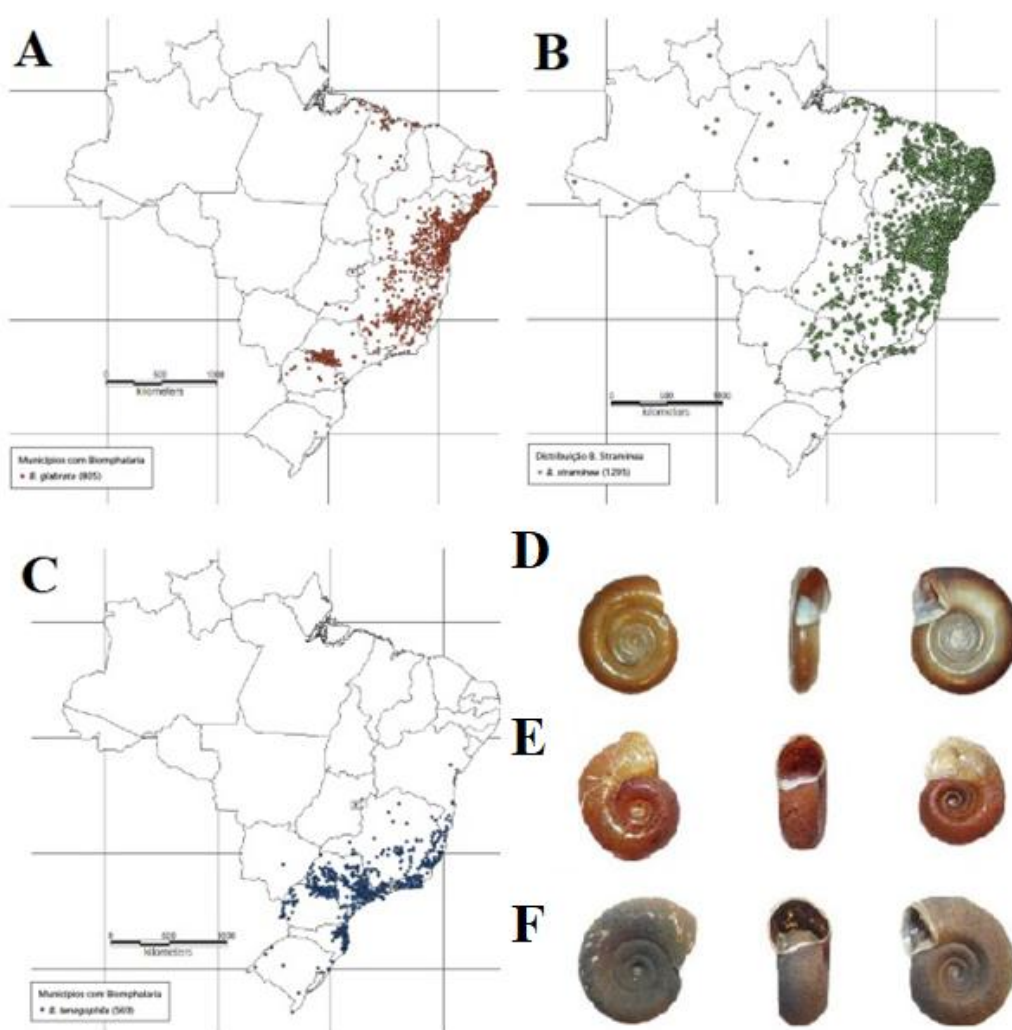
Fonte: CCD, 2017 (Adaptado).

2.3 Gênero *Biomphalaria*

O gênero *Biomphalaria* spp. é de grande importância epidemiológica para a manutenção da esquistossomose humana, pois é o hospedeiro intermediário do gênero *Schistosoma* spp. São caramujos pertencentes ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora e Família Planorbidae (VINTHER, 2014). Das espécies de *Biomphalaria* existentes, onze já foram identificadas no Brasil, são elas: *B. tenagophila* (Orbigny), *B. straminea* (Dunker), *B. glabrata* (Say), *B. amazonica* (Paraense), *B. peregrina* (Orbigny), *B. occidentalis* (Paraense), *B. intermedia* (Paraense & Deslandes), *B. schrammi* (Crosse), *B. oligoza* (Paraense) e *B. kuhniana* (Clessim). Destas, as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* estão distribuídas nos estados endêmicos do Brasil (Figura 8 A – C) e são os hospedeiros naturais com a capacidade de eliminar cercárias, portanto, são vetores do *S.*

mansoni (NEVES, 2016; OLIVEIRA et al., 2020, VALLADARES et al., 2021). Como características apresentam uma concha castanha, podendo variar de marrom a negro, dependendo do ambiente, discoidal arredondada, com depressão no giro central em ambos os lados (Figura 8 D - F).

Figura 8 - Distribuição espacial das espécies no Brasil e Morfologia de concha de (A e D) *Biomphalaria glabrata*, (B e E) *Biomphalaria straminea* e (C e F) *Biomphalaria tenagophila*.



Fonte: Brasil, 2014 (Adaptado)

Esses caramujos apresentam tentáculos longos e filiformes, com os olhos localizados na base dos tentáculos, pé oblongo, boca contornada pela mandíbula (formato de T), hemolinfa vermelha (hemoglobina), abertura genital masculina localizada atrás da base do tentáculo esquerdo e a abertura genital feminina atrás, sob a pseudobrânquia (PARAENSE, 2008; BRASIL, 2008; NEVES, 2016; OHLWEILER et al., 2020).

O habitat de *Biomphalaria* spp. é costumeiramente em ambientes hídricos naturais ou artificiais de águas doces paradas e/ou pouco movimentadas, geralmente com boa luminosidade e temperatura (20-30°C), presença de matéria orgânica, pH neutro (entre 7-8), baixa salinidade, microflora rica (algas, bactérias e plantas aquáticas) com vegetação próxima (KALINDA; CHIMBARI; MUKARATIRW, 2017; LOPES et al., 2017; BEZERRA et al., 2018; HABIB et al., 2021). Quanto sua reprodução, é capaz de se reproduzir de duas formas, hermafroditismo, através da autofecundação e através da fecundação cruzada, sendo esta preferencial, por resultar em maior variabilidade genética (VIANEY-LIAU; DUSSART, 2002; PARAENSE, 2008; NEVES, 2016).

2.3.1 *Biomphalaria glabrata*

A espécie *B. glabrata* é o maior caramujo dentre os planorbídeos com sua concha podendo atingir 40 mm de diâmetro, 11 mm de largura com seis a sete giros (Figura 9).

Figura 9 – Caramujos *Biomphalaria glabrata*



Fonte: O autor (2022)

B. glabrata é uma das espécies mais estudada pela área malacológica sendo considerado o mais importante hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no Brasil (NEVES, 2016). Possui alta suscetibilidade à infecção por várias linhagens de *S. mansoni* (ZANOTTI-MAGALHÃES et al., 1991; BASTOS et al., 1978; COIMBRA-JÚNIOR, 1981), ampla distribuição geográfica

e plasticidade ecológica, os altos níveis de infecção além da capacidade de liberar cerca de 4500 cercárias/dia (MORGAN et al., 2001; DEJONG et al., 2001; PARAENSE, 2001; CAMPOS et al., 2002; BRAGA, 2012; CANTINHA, 2012; BARBOSA et al., 2013; BRASIL, 2014; SANTOS et al., 2015).

A oviposição é realizada diariamente, normalmente a noite, de forma superficial em plantas, pedras, conchas de outros caramujos como também em recipientes de plástico ou vidro presente na água. A massa ovígera contém 20–50 ovos em camada única, formado por uma cápsula transparente rica em galactogênio, proteínas, glicogênio, polissacarídeos e lipídios envoltos por uma membrana externa protetora (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010; TALLARICO et al., 2014; MELO et al., 2019).

Com relação as características embrionárias de *B. glabrata*, dentro das desovas de *B. glabrata*, na massa ovígera, estão presentes ovos (medindo cerca de 100µm de diâmetro) contendo um embrião. O desenvolvimento desses embriões até a eclosão leva cerca de 7-9 dias, iniciam sua maturação a partir das primeiras clivagens, tornando-se consistentes e amareladas e permanecem até a eclosão dos caramujos jovens (CAMEY; VERDONK, 1969; NAKANO et al., 2003; TALLARICO et al., 2014; SILVA et al., 2020a).

A diversidade celular apresentada pelo *B. glabrata* inclui diferentes transformações: diferenciação (produção e organização de diversos tipos de células), morfogênese (organização das diferentes células em tecidos e órgãos), crescimento (aumento do tamanho e número celular) e reprodução, responsável pela propagação da espécie (KAWANO et al., 2003). Dessa forma, é possível descrever e identificar os estádios embrionários de *B. glabrata*, sendo caracterizados e classificados como blástula, gástrula, trocófora, véliger e Hippo stage (Figura 10) (KAWANO et al, 1992; ARAÚJO et al., 2018; BATISTA et al., 2022).

No período correspondente de 0 a 15 horas após a primeira clivagem (Figura 10A) é denominado blástula. Este estágio é caracterizado por uma grande quantidade de divisões mitóticas, porém sem o aumento de volume celular (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO et al., 2003; RAPALDO et al., 2013).

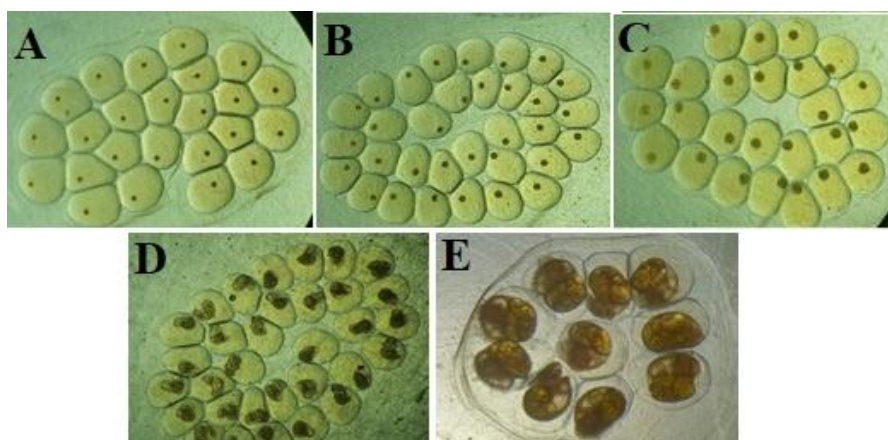
Em gástrula, 24 horas após a primeira clivagem, é iniciado a gastrulação, processo de invaginação ou endobolia caracterizada principalmente pelo início do crescimento, diferenciação e movimentação celular. O embrião modifica sua forma de arredondada para achatada em uma direção animal-vegetativa (Figura 10B), com o aparecimento da boca no fim desta fase (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO et al., 2003; RAPALDO et al., 2013).

Trocófora (Figura 10C) é o estágio correspondente entre 48 e 87 horas após a primeira clivagem. Nesse estágio ocorre a organogênese, sendo essa, a primeira fase larval de *B. glabrata*, caracterizada pela formação do prototroco, dupla fileira celular encontrada anterior a boca, dividido em regiões pré-trocal e pós-trocal. A região pré-trocal dará origem a região dos olhos e tentáculos, e a vesícula cerebral. Na região pós-trocal encontra-se a boca, localizada abaixo da placa apical e na região oposta encontra-se a glândula da concha. Essas regiões são formadas por cílios que possibilitam a movimentação do embrião, característica essencial para diferenciação dessa fase (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO et al., 2003; RAPALDO et al., 2013).

O estágio de véliger (96 e 120 horas após a primeira clivagem) é caracterizado por uma maior formação da concha e pé, que então inicia o enrolamento cobrindo todo o corpo (Figura 10D). O velum (antes prototroco) é responsável pela movimentação intensa da larva dentro do ovo e as placas cefálicas apresentam a futura região do olho e do tentáculo.

Após 120 horas da primeira clivagem, ocorre a formação completa do embrião denominado hippo stage (Figura 10E). Os olhos e os tentáculos já estão bem desenvolvidos e a concha cobre quase toda a totalidade do corpo e do pé da larva formando quase um caramujo jovem. O momento da eclosão é considerado o período crucial na embriogênese e comumente ocorre após 144 horas da oviposição da massa ovígera (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO et al., 2003; RAPALDO et al., 2013).

Figura 10 – Diferentes estádios embrionários de *B. glabrata*, sendo (A) Blástula, (B) Gástrula, (C) Trocófora, (D) Véliger e (E) Hippo stage.



Fonte: O autor (2022).

O estudo biológico das fases embrionárias de *B. glabrata* é de grande importância, uma vez que a análise de compostos moluscicidas com ação embriotóxica pode contribuir com a

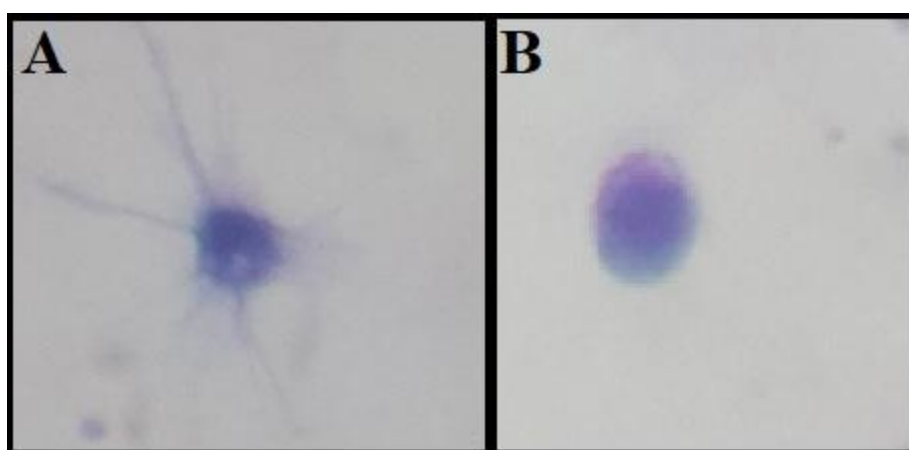
redução da população de adultos e da transmissão, e consequentemente da prevalência da esquistossomose (TANG et al., 1995; KAWANO et al., 2008).

2.3.2 Características da hemolinfa de *B. glabrata*.

O sistema imune dos caramujos pode ser separado em dois grandes grupos: células da hemolinfa (fluido análogo ao sangue) e células fixas. Nas reações de defesa de *B. glabrata*, há majoritariamente os hemócitos (Figura 11), com características similares aos macrófagos, participando do reconhecimento de corpos estranhos e fagocitose sendo capaz de causar lise e encapsulamento semelhantes aos granulomas (JOHNSTON; YOSHINO, 2001; BURGOS-ACEVES; FAGGIO, 2017; HUANG et al., 2018; MONTE et al., 2019).

Os caramujos possuem sistema circular semiaberto, dessa forma a hemolinfa é bombeada pelo coração chegando aos espaços intersticiais de vários órgãos (LOCKYER et al., 2008; ABO-AL-ELA; FAGGIO, 2021). Os hemócitos são divididos em dois tipos celulares principais: Hialinócito (Figura 11A), pouco granulado e granulócito (Figura 11B), com muito grânulos citoplasmáticos (CAVALCANTI et al., 2012; LADHAR-CHAABOUNI; HAMZA-CHAFFAAI, 2016; PILA et al., 2016; SCHULTZ; ADEMA, 2017; MACHALOWSKI; JESIONOWSKI, 2021).

Figura 11 – Diferença morfológica entre hemócitos (A) Granulócito e (B) Hialinócito de *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: O autor (2022)

2.4 NICLOSAMIDA

Atualmente, o controle da esquistossomose concentra-se na quimioterapia de pacientes infectados (WHO, 2019). Contudo, o controle aos vetores destaca-se na prevenção da disseminação da doença, pois interrompendo a transmissão do *S. mansoni* evita, consequentemente, a reinfeção após o tratamento. A partir do uso de novas drogas eficazes e seguras como o praziquantel, o uso de moluscidas começaram a atuar como medida auxiliar no controle a esquistossomose e o homem se tornou o foco no controle da transmissão da doença (WHO 1980)

Desde 1960, a niclosamida (5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-hidroxibenzamida) é o único moluscida comercialmente disponível recomendado pela Organização Mundial de Saúde. Foi descoberta em 1953 pelos laboratórios de pesquisa de quimioterapia da Bayer e seis anos depois comercializada como Bayluscida, sendo utilizada até hoje para o controle da esquistossomose (ANDREWS; THYSSEN; LORKE, 1983; CHEN et al., 2018). Este composto apresenta peso molecular de 327,12 g/mol, solúvel em etanol, clorofórmio, éter, pouco solúvel em água e possui forma de cristais amarelo pálido (BARBOSA et al., 2019).

Embora seu mecanismo de ação ainda não tenha sido elucidado, a niclosamida, em baixas concentrações, é efetivo nos diversos estádios embrionários (ARAÚJO et al., 2018a; MELO et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2020; ARAÚJO et al., 2020a; RIBEIRO et al., 2021ab) causando efeito embriotóxico, como também em adultos *Biomphalaria* spp. (ARAÚJO et al., 2018a; FARIA et al., 2018; BATISTA et al., 2022) causando a mortalidade desses caramujos. Além disso, quando utilizada contra cercárias de *S. mansoni*, estágio infeccioso para o homem, hospedeiro definitivo, o composto demonstrou-se tóxico (ARAÚJO et al., 2020b; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; SILVA et al., 2020b). Acredita-se que a niclosamida atue principalmente na respiração e metabolismo de carboidratos, impedindo o processo de obtenção de energia pelo organismo alvo (ANDREWS; THYSSEN; LORKE, 1983; CHEN et al., 2018). Mesmo tendo uma alta eficácia, a niclosamida apresenta diversas desvantagens, principalmente ambientais, o composto é resistente a variações de pHs por mais de 4 meses, enquanto sua degradação no ecossistema, sedimento/água de rios e lagoas produz meia-vida de 1-9 dias (GRAEBING et al., 2004).

Quando avaliado o impacto da niclosamida em modelos animais, o composto demonstrou capacidade tóxica com alterações no metabolismo lipico em *Danio rerio* (ZHU et al., 2020) e efeito de dano acumulativo em diferentes peixes de água doce (LIU et al., 2015, 2018). Além disso, ao ser absorvido pelo solo, é capaz de migrar da raiz para o caule, permanecendo cerca de 43 dias até ser eliminado (LUO et al., 2018). Portanto, nesse contexto,

é necessário desenvolver novos moluscicidas eficazes e de baixa toxicidade para organismos não-alvo, consequentemente, menos ecotoxicidade.

2.5 MOLUSCICIDAS VEGETAIS

Diante do interesse em estudar substâncias obtidas de plantas, das limitações econômicas e ambientais dos moluscicidas sintéticos incentivaram a pesquisa por novos candidatos moluscicidas de origem vegetal. Dessa forma, o uso de plantas com essa propriedade, pode ser uma alternativa eficaz, biodegradável e segura (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985; SINGH et al., 1996; CLARK; APPLETON, 1997; KUMAR; SING, 2006; SILVA-FILHO et al., 2009). Os requisitos para atestar a eficiências dessas moléculas são sua biodisponibilidade e capacidade de propagação em regiões endêmicas para esquistossomose. Além disso, serem facilmente obtidas, solúveis em água, capacidade de causar toxicidade contra todas as fases de desenvolvimento do caramujo e baixa toxicidade ambiental (EVANS, 2009).

O interesse pela utilização de plantas como moluscicidas foi iniciado em 1930. O plantio de árvores típicas do deserto, a *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile (Balanitaceae), como moluscicida em focos de transmissão da esquistossomose no Sudão. Os frutos dessa espécie, ao serem estudados, mostrou redução da população de caramujos transmissores sem alterar as características da água (ARCHIBALD, 1933; LEYTON et al., 2005). Na década de 1960, extratos aquosos dos frutos de *Phytolacca dodecandra* L'ela (Phytolaccaceae), foram aplicadas, pela primeira vez, em focos ativos de transmissão de *Schistosoma mansoni* em áreas da Etiópia durante cinco anos para prevenção da esquistossomose, tendo resultados positivos na redução da prevalência da doença (KLOOS; MCCULLOUGH, 1982). Já no Brasil, estudos com extrato aquoso de caule de *Serjania spp.* e frutos de *Sapindus saponária* utilizando *B. glabrata* como modelo animal, demonstrou que o efeito tóxico notado era atribuído a presença de saponinas na composição desses vegetais (PINTO; ALMEIDA, 1944). Além disso, recentemente estudos com extrato salino e fração de sementes de *Parkia pendula* demonstraram efeito tóxico contra embriões e adultos de *B. glabrata* como também cercárias de *S. mansoni*, demonstrando a capacidade que essas preparações vegetais possuem de substituírem o niclosamida no futuro (BATISTA et al., 2022)

2.6 GÊNERO *Bauhinia*

A família das Fabaceas é uma das mais abundantes em número de gêneros e espécies no reino vegetal. Das três subfamílias, Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae, constituído por aproximadamente 300 espécies (20% no Brasil), o gênero *Bauhinia* é o destaque, sendo encontrado em regiões tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental e oriental, utilizado na composição de diversos fitoterápicos (ENGLER, 1964; MELO et al., 2011; HAVER, 2002).

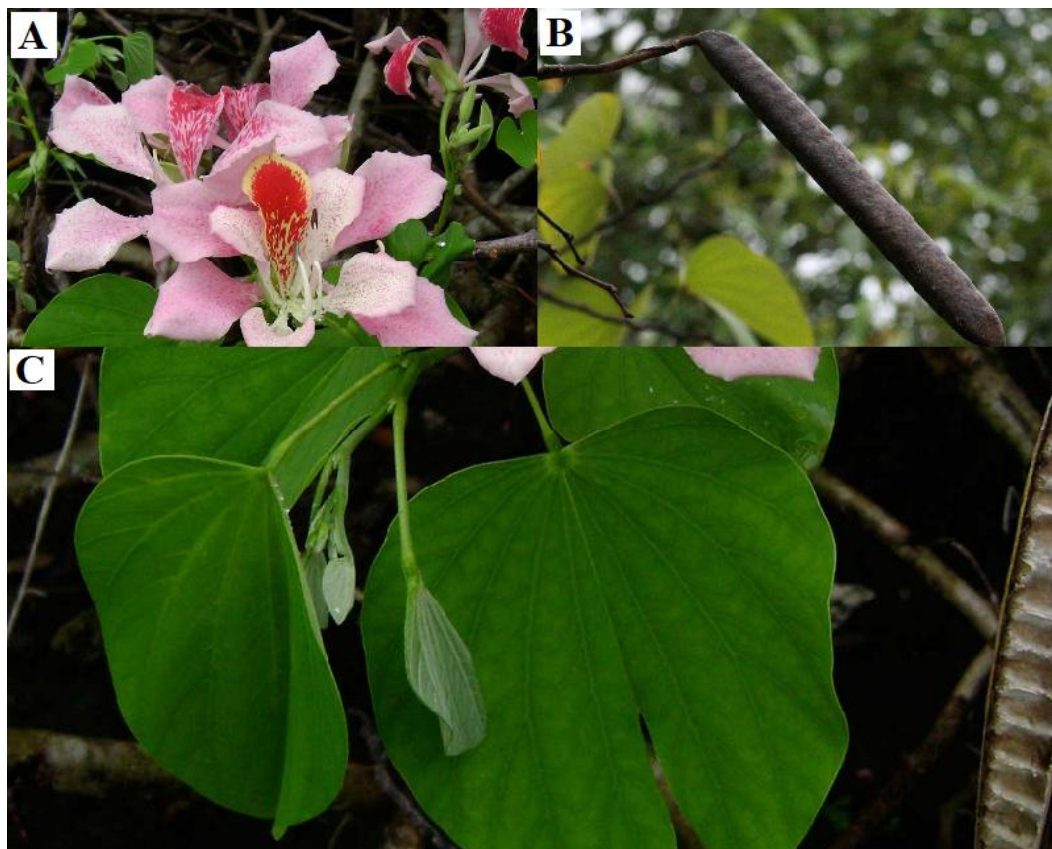
Dentre diversas aplicações desse gênero destaca-se o uso principalmente como adstringente, cicatrizante, anti-inflamatória, antialérgica, tônico, expectorante, hipocolesterolemia, diminuição da glicose sérica, efeito diurético e anti-hipertensiva, antioxidante, bactericida e inseticida (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; ARGOLO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2006; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA, FREITAS; BARBOSAFILHO, 2007; CARNEIRO et al., 2014).

2.5.1 *Bauhinia monandra*

Pertencente a subfamília Caesalpinioideae e gênero *Bauhinia*, a espécie *Bauhinia monandra* Kurz, devido a característica singular de suas folhas em formato bifoliado é conhecida popularmente por “Pata-de-vaca” na Amazônia, com grande valor econômico, por Unha-de vaca” e “Orquídea dos pobres” (LEWIS, 1987; BORGES; MENDONÇA, 2009), utilizada com fins ornamental e principalmente medicinal (MARTINS et al., 1995).

B. monandra é um arbusto ou uma árvore perene, atingindo até 15 metros de altura, com flores de branco a róseas com apenas um estame (Figura 12), característica que nomeou a espécie (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). São plantas que crescem preferencialmente em solos secos e com pouco nutrientes e seu fruto é uma vagem (ALVES; BRETT, 2002). Em Pernambuco, podem ser encontradas espécies nativas como *B. chelantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. membranacea* Benth, *B. monandra* Kurz, entre outras (ALVES et al., 2002).

Figura 12 – Aspectos físicos característicos da *Bauhinia monandra* Kurz, sendo (A) Flores, (B) Vagem e (C) Folhas.



Fonte: O autor (2022)

Dentre as características biológicas pesquisadas, a *B. monandra* tem potencial de modular a diabetes em ratos induzida experimentalmente (MCCUNE; JOHNS, 2002) e essa capacidade pode estar relacionada à presença de metabolitos secundários com atividade antioxidante (ANOSIKE, OBIDOA; EZEANYIKA, 2012). Extratos de folhas de *B. monandra* se destacam nessa capacidade antioxidante por meio de suas ações inibitórias *in vitro* sobre radicais livres de DPPH, radicais de peróxido de hidrogênio e radicais livres de íons ferrosos (NWORIE; OKORIE, 2018). Extratos clorofórmicos e acetato de etila das folhas de *B. monandra* Kurz contém compostos com significantes efeitos antioxidantes (flavonoides e esteroides) (ARGOLO et al., 2004) e o extrato etanólico apresentou atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes tipo 2 induzida também relacionada a atividade antioxidante. Dentre esses metabólitos, foi detectada a presença de rutina no extrato hidroetanólico das folhas de *B. monandra* (FERNANDES et al., 2012).

2.6 LECTINAS DE PLANTAS

O termo lectina, originado do latim “lectus” (significa selecionado, escolhido) designa um grupo de proteínas que apresentam a característica de ligarem-se específica e seletivamente a resíduos de carboidratos de uma forma não covalente (BOYD; SHAPLEIGH; 1954; HONG et al., 2001). São definidas, atualmente, como uma classe de proteínas ou glicoproteínas que contêm um ou mais sítios de ligação para carboidratos ou derivados sem apresentar função catalítica nem características estruturais imunológicas e que se ligam específica e reversivelmente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). São também conhecidas como aglutinina devido à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; KENNEDY et al., 1995; MATSUI et al., 2001). A hemaglutinação permite avaliar a estabilidade da lectina a variações de pH e temperatura, podendo determinar as condições a serem usadas nas aplicações biotecnológicas (PAIVA et al., 2010). Dessa forma, as lectinas interagem com carboidratos, aglutinam células e precipitam polissacarídeos, sem alterar suas estruturas (RATANAPO et al., 1998; ISKRATSCH et al., 2009).

Lectinas são encontradas de forma ubíqua na natureza, pois se fazem presente em todas as classes e famílias de organismos. São encontradas desde bactérias (BÖCKELMANN ET AL., 2003), fungos (BHOWAL ET AL., 2005), vírus (VIJAYAN; CHANDRA, 1999); protozoários (BABÁL et al., 1999), insetos (CHEN et al., 1999), moluscos (ARREGUÍN-ESPINOSA; ARREGUÍN-LOZANO, 1997), crustáceos (ALPUCHE et al., 2005). Estão presentes também em vegetais superiores em todos os tecidos como nas folhas (COELHO; SILVA, 2000), cascas, bulbos, tubérculos (RÜDIGER; GABIUS., 2001; SUSEELAN et al., 2002), sementes (SULTAN; SWAMY, 2005), raízes (SOUZA et al., 2011), frutos, rizomas (PEUMANS et al., 2001; SAMPIETRO et al., 2001; TATENO et al., 2003), cerne (SÁ et al., 2009) e ainda em células-tronco embrionárias (ALVAREZ-MANILLA et al., 2010).

As lectinas nos animais participam no processo da endocitose, transporte intracelular de glicoproteínas (MECKLENBURG et al., 2002), efeito cicatrizante (PEREIRA et al., 2012), apoptose (SUZUKI et al., 2008), defesa contra microrganismos, na regulação da migração e adesão celular (JANKOVIC; GOLUBOVIC, 2000), influência na homeostasia de leucócitos, principalmente em células linfocitárias (KIPATRICK, 1999), ação pró-inflamatória na modulação de processos inflamatórios (STOWELL et al., 2008) e inseticida (SANTOS et al., 2013). Na microbiologia, já é destacado ação contra o crescimento de bactérias (Gram negativas e positivas), além de ação contra fungos (KNAUT, 2016), devido a sua capacidade em

reconhecer pequenas diferenças estruturais de carboidratos complexos presentes na superfície celular desses organismos (LUO et al., 2007). Algumas, por exemplo, apresentam participação na atividade antitumoral devido a sua ação imunomodulatória (TIMOSHENKO et al., 2001), pois possui habilidade em detectar alterações em células malignas e redução do potencial tumoral (SINGH, SINGH; KAMBOJ, 2004).

A BmoLL, uma lectina específica a galactose, é purificada a partir das folhas da *Bauhinia monandra* (COELHO; SILVA, 2000). Essa lectina possui habilidade de interagir com monocamadas de lipídios por medidas de tensão de superfície (ROSILIO et al., 2004). Entre suas aplicações biológicas, BmoLL reconhece de forma seletiva diferentes sorotipos de dengue, devido aos diferentes padrões de glicoproteínas nos soros produzidos pela resposta imune em pacientes dengue soro positivos (ANDRADE et al., 2011), apresentando ação inseticida contra larvas de *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO et al., 2007) e possível efeito antioxidante sem apresentar genotoxicidade nem citotoxicidade em células e bactérias (SISENANDO et al., 2009).

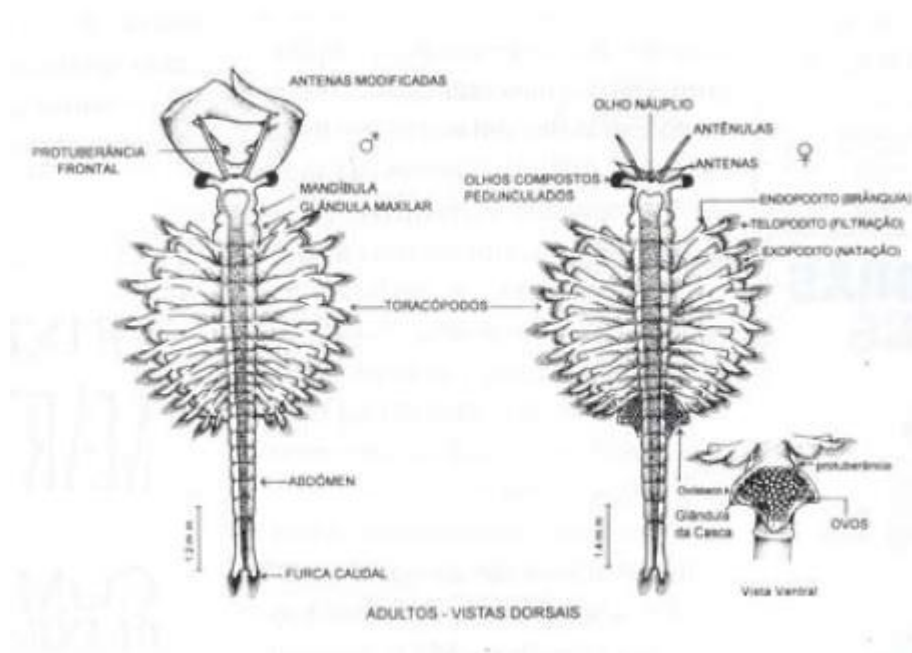
2.7 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

2.7.1 *Artemia salina*

A *Artemia salina* é uma espécie de crustáceo capaz de viver em ambientes extremamente secos, dessa forma, tem se destacado por sua ampla aplicação em testes ecotoxicológicos com moléculas obtidas de fontes vegetais (LUNA et al., 2005; ROCHA-FILHO et al., 2015; SÁ et al., 2016) ou compostos sintéticos (nanomateriais, microplásticos e/ou metais iônicos) (MADHAV et al., 2017; WANG et al., 2017; DANABAS et al., 2020). O gênero *Artemia* no geral apresenta características similares como adaptabilidade a variedade de salinidade (5-250 g L⁻¹) e temperatura (6-35 °C), ciclo de vida curto, reprodução partenogenética (com produção de náuplios ou cistos), tamanho corporal pequeno e recursos nutritivos variados (NUNES et al., 2006; GAJARDO; BEARDMORE, 2012).

Dentre as características morfológicas, a estrutura corporal da *Artemia* é formada por cabeça, olhos compostos, lábio, antenas, mandíbulas, maxilas, tórax (onze segmentos) e com oito segmentos, o abdômen (Figura 13). Os segmentos genistais são dois segmentos abdominais anteriores e destes, o primeiro carrega os gonópodes, responsável pelo útero da fêmea ou as penes emparelhadas do macho. Além disso, o corpo é coberto por um exoesqueleto fino e flexível de quitina, com os músculos fixados internamente (CRIEL; MACRAE, 2002; DHONT et al., 2013).

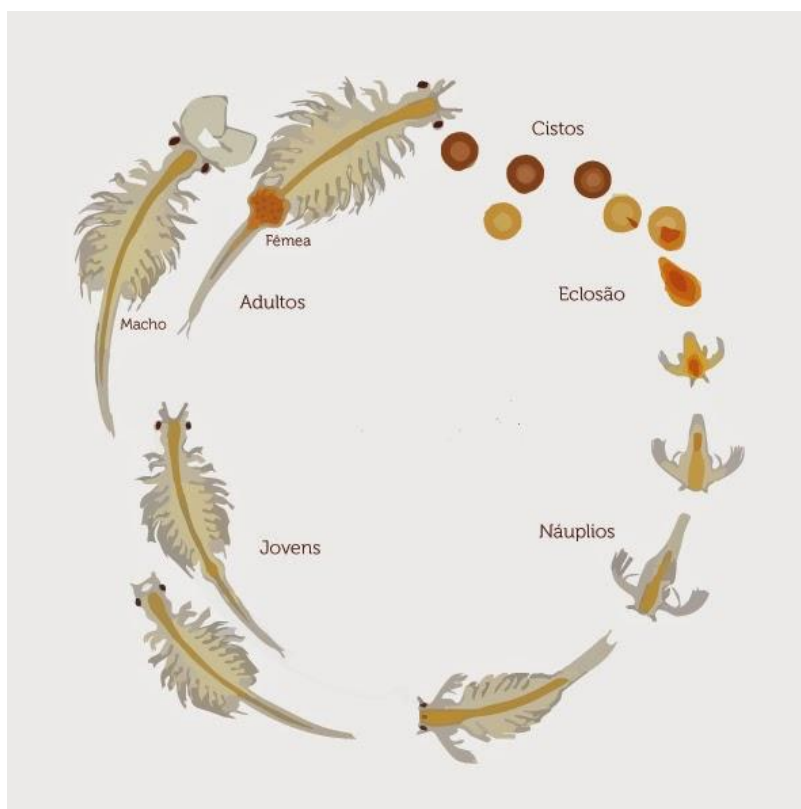
Figura 13 – Morfologia da *Artemia Salina*



Fonte: Vinatea (2018)

O ciclo de vida da *Artemia* inicia-se quando fêmeas grávidas produzem filhotes por meio das vias ovovíparas (Figura 13), náuplios nadadores livres, ou ovíparas (estágio dormiente) (MUNTEANU, 2011; WEN-MING et al., 2013). Os cistos dormentes estão inicialmente em estado quiescente, com diversas mudanças endógenas para que quando as condições ambientais e climáticas forem favoráveis, ocorra a eclosão do embrião (MA et al., 2013; IRYANI et al., 2020; MARDEN; BROWN; BOSTEELS, 2020; SELLAMI; NACEUR; KACEM, 2021). Após a eclosão, os denominados náuplios passam por diversas transformações e maturação até atingir a fase adulta (MARDEN; BROWN; BOSTEELS, 2020).

Figura 13 – Ciclo de vida da *Artemia salina*.



Fonte: Jpets (2014) (Adaptado)

O ensaio de letalidade com *Artemia salina* é rápido e requer recursos mínimos (RAJABI et al., 2015), mostrando-se muito vantajoso, devido sua praticidade, baixo custo e possuir resultados confiáveis. Esses testes consistem na exposição dos náuplios por aproximadamente 24-48 horas (fases II ou III) em diferentes concentrações da amostra analisada para a observação da mortalidade ao final do período de exposição (PACHECO et al., 2021).

2.7.2 *Danio rerio*

A avaliação da ecotoxicidade ambiental de substâncias depende da realização de estudos *in vivo* através da exposição aguda, subcrônica e crônica e que possam prever efeitos fisiopatológicos (ZBINDEN, 1991). Durante décadas, ratos e camundongos representaram os principais alvos para estudos de toxicidade em humanos. Entretanto, nos últimos anos a utilização desses vertebrados modelo tem sido reduzida, substituída ou refinada como parte do princípio dos 3Rs em experimentação animal (do inglês reduction, replacement e refinement) (GONÇALVES et al., 2020). Neste contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*), também conhecido como zebrafish ou paulistinha, figura como promissora alternativa em estudos de toxicidade devido ao baixo custo de produção, desenvolvimento rápido, a elevada homologia do seu

genoma com o humano e a possibilidade de mensurar diversos endpoints de toxicidade - os quais, em conjunto, facilitam a criação de plataformas de screening de alto rendimento (high-throughput screening) (ZHANG; PETERSON, 2020).

O *D. rerio* é uma espécie de peixe tropical de água doce nativa do sul da Ásia e membro da família *Cyprinidae* (HAMILTON, 1822). É considerado um peixe de pequeno porte (3-5 cm), geralmente encontrado em água parada ou lenta, pH de aproximadamente 8,0; clareza relativamente alta (± 35 cm), alimenta-se de ração seca (100 microns para larvas, 300/400 microns para peixes adultos) ou espécies de *Artemia*, possuindo um padrão de cor distinto com base em listras horizontais escuras e claras de forma alternada (Figura 15) (LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008; AVDESH et al., 2012).

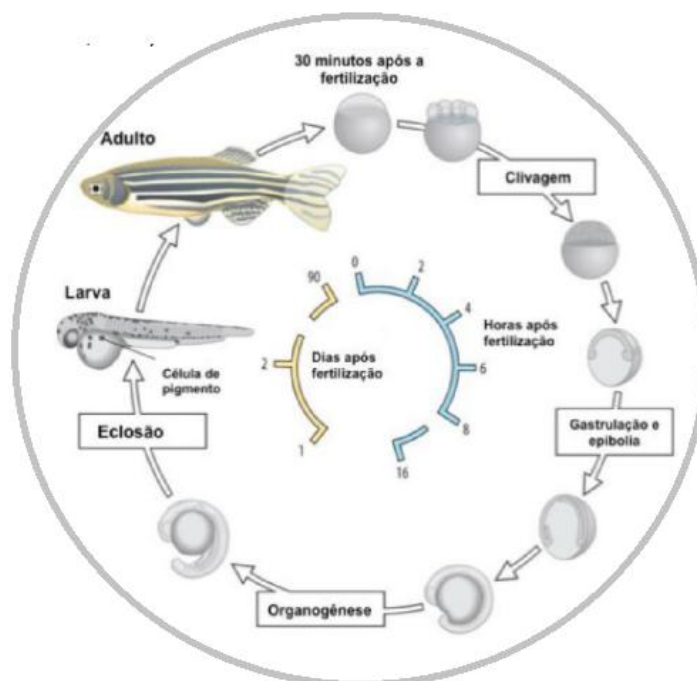
Figura 15 – *Danio rerio* (Peixe-zebra).



Fonte: Basu et al., 2013 (Adaptado)

Quanto ao ciclo de vida, um embrião de *D. rerio* se desenvolve após 36 horas da sua fertilização (Figura 16). Dessa forma, o óvulo fertilizado sofre diversas divisões mitóticas para formar uma capa de células durante a gastrulação e em seguida, desenvolve-se um eixo corporal alongado com cabeça e cauda óbvias. As larvas são inicialmente imóveis, com movimentos de cauda ocasionais que após de cinco dias, nadam até a superfície e o ar presente infla suas bolsas de gás. Depois disso, tornam-se capazes de nadar de forma contínua, bem como se alimentar só. Um mês após a fertilização, ocorre a metamorfose e envolve a perda da nadadeira larval, remodelação do sistema intestinal e nervoso, assim como surgimento de escamas e características sexuais secundárias, diminuindo o crescimento à medida que o peixe adulto atinge a maturidade reprodutiva e começa a gametogênese (três meses) (D´COSTA; SHEPHERD, 2009).

Figura 16 – Ciclo de vida do *Danio rerio*.



Fonte: COSTA; SHEPHERD, 2014 (Adaptado)

D. rerio tem ainda se mostrado como um sistema modelo versátil, sendo utilizado desde estudos de exposição aguda com embriões a investigações ao longo do desenvolvimento e até transgeracionais (WIRBISKY et al., 2016; CLEARY et al., 2019). Dessa forma, essa espécie tem muitas semelhanças fisiológicas e genéticas com os humanos, incluindo o cérebro, trato digestivo, musculatura, vasculatura e sistema imunológico inato (LIESCHKE et al., 2001; WEINSTEIN, 2002; GUYON et al., 2007; GORE et al., 2012; KANUNGO et al., 2014; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; ZHAO; HUANG; YE, 2015). Além disso, 70% dos genes de doenças humanas têm semelhanças funcionais com essa espécie (SANTORIELLO; ZON, 2012). Com isso, *D. rerio* tem sido amplamente utilizada como organismo modelo para estudos toxicológicos, devido a sua fácil acessibilidade, grande quantidade de embriões produzidos a cada ciclo de reprodução, tamanho pequeno e é bastante sensível a uma grande quantidade de substâncias químicas (DAÍ et al., 2014; GIANNACCINI et al., 2014; SNEDDON; HALSEY; ENTERRAR, 2017). Nos últimos anos, avaliação genotóxica quanto aos danos no DNA e mecanismo de reparo dessa espécie tem sido realizado, tendo em vista que o genoma desse peixe tem genes ortólogos envolvidos em todas as vias de reparo de DNA em eucariotos (CHANG et al., 2017; MARTINS et al., 2018; AKSOY et al., 2019; COSTA et al., 2019).

Uma vez que, as aplicações biológicas reportadas para as folhas de *B. monandra* foram direcionadas apenas para a lectina isolada, e sabendo que extrato e frações enriquecidas podem apresentar resposta ao alvo biológico e da vantagem de custos no processo de purificação e isolamento de lectinas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade das preparações (extrato salino e fração) de folhas de *B. monandra* sobre diferentes estágios de desenvolvimento de *B. glabrata* (embriões e caramujos adultos), parâmetros reprodutivos (fecundidade e fertilidade) e sobrevivência, citotoxicidade e genotoxicidade, além de analisar atividade cercarecida de *S. mansoni* e sua ecotoxicidade ambiental utilizando o bioindicador *Artemia salina* e *Danio rerio*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar preparações de folhas de *Bauhinia monandra* contendo a Lectina BmoLL sobre *Biomphalaria glabrata*, resposta humoral, cercárias de *Schistosoma mansoni* e monitoramento ambiental com *Artemia salina*.

3.2. Específicos

- Obter as preparações extrato salino e fração de folhas de *B. monandra*;
- Avaliar a atividade moluscicida do extrato salino e fração sobre embriões e caramujos adultos da *B. glabrata*;
- Avaliar parâmetros de fertilidade e fecundidade da *B. glabrata* após exposição ao extrato salino e fração protéica;
- Avaliar a citotoxicidade sobre hemócitos de *B. glabrata* (micronúcleos, binucleadas e outras anomalias hemocitárias) após exposição ao extrato salino e fração protéica;
- Ensaio do cometa sobre a *B. glabrata* após exposição ao extrato salino e fração;
- Avaliar a atividade cercarecida do extrato salino e fração;
- Avaliar a segurança ambiental das preparações com o bioindicador *Artemia salina*.

4. REFERÊNCIA

ABE, E.M.; GUAN, W.; GUO, Y.H.; KASSEGNE, K.; QIN, Z.Q.; XU, J.; CHEN, J.H.; EKPO, U.F.; LI, S.Z.; ZHOU, X.N. Differentiating snail intermediate hosts of *Schistosoma* spp. using molecular approaches: fundamental to successful integrated control mechanism in Africa. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 26, p. 7-26, 2018. Doi:10.1186/s40249-018-0401-z.

ABO-AL-ELA, H.G.; FAGGIO, C. MicroRNA-mediated stress response in bivalve species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 11442, 2021. Doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111442.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AKSOY, Y.A.; NGUYEN, D.T.; CHOW, S.; CHUNG, R.S.; GUILLEMIN, G.J.; COLE, N.J.; HESSELSON, D. Chemical reprogramming enhances homology-directed genome editing in zebrafish embryos. **Communications Biology**, v. 2, p. 1-9, 2019. Doi:10.1038/s42003-019-0444-0.

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 Trop.** 138, 23-27, 2014. Doi: 10.1016/j.actatropica.2014.06.005.

ALBUQUERQUE, U.P.; MUNIZ DE MEDEIROS, P.; DE ALMEIDA, A.L.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; GOMES DE MELO, J. DOS SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plantas: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, p.1-10, 2006.

ALMEIDA, E.R.; GUEDES, M.C.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; XAVIER, H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 276-278, 2006.

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; VÁZQUEZ, L.; ZENTENO, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1724, p. 86–93, 2005. Doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.04.014

ALVAREZ-MANILLA, G.; WARREN, N.L.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; DALTON, S.; PIERCE, M. Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells:identification of potencial glycobiomarkers using lectin Affinity chromatography of glycopeptides. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2062-2075, 2010.

ALVES, V.A.; BRETT, C.M.A. Characterisation of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS. **Eletrochimica Acta**, v. 47, p. 2081, 2002.

ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.; MELO, C.P.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; NOGUEIRA, M.L.; SINGH, P.R.; ZENG, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 517-523, 2011.

ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 245-295, 1983. Doi:10.1016/0163-7258(82)90064-x.

ANOSIKE, C.A; OBIDOA, O.; EZEANYIKA, L.U.S. The anti-inflammatory activity of garden egg (*Solanum aethiopicum*) on egg albumin-induced oedema and granuloma tissue formation in rats. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, p. 62-66, 2012. Doi:10.1016/S1995-7645(11)60247-2.

ARCHIBALD, R. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the sudan. Transactions of the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 207–210, 1933. Doi:10.1016/s0035-9203(33)90011-5.

ARAÚJO, C. S. F.; ARAUJO, T. F. S.; SILVA, C. B.; CAMPOS, J. K. L.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B. Evaluation of toxicity on mice and artemicidal activity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Theory Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1, 44-52, 2019. Doi: 10.9734/bpi/tamb/v1.

ARAÚJO, H.D.A.; SILVA, H.A.M.F.; SIQUEIRA, W.N.; SANTOS, V.H.B.; LIMA, M.V.; SILVA JÚNIOR, J.G.S.; SILVA, N.H.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; MELO, A.M.M.A.; AIRES, A.L.; COELHO, L.C.B.B. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) in-fected and not infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.** v. 222, p. 106067, 2021. Doi:10.1016/j.actatropica.2021.106067.

ARAÚJO, P.S.; CAIXETA, M.B.; BRITO, R.S.; GONÇALVES, B.B.; SILVA, S.M.; LIMA, E.C.O.; SILVA, L.D.; BEZERRA, J.C.B.; ROCHA, T.L. Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: Implications for control of intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.** v. 211, p. 2-8, 2020a. Doi:10.1016/j.actatropica.2020.105644.

ARAÚJO, H.D.A.; SANTOS, V.H.B.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C.; SILVA, N.H.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A.L.; LIMA, V.L.M. In vitro activity of usnic acid potassium salt against different developmental stages of *Schistosoma mansoni*: An ultrastructural study. **Acta Trop.** v. 201, p. 2-11, 2020b. Doi:10.1016/j.actatropica.2019.105159.

ARAÚJO, H. D. A.; SILVA, L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S. M.; SILVA, N. H.; MELO, A. M. M. A.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, V. L. M. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. **Acta Trop.** 179, 39-43, 2018a. Doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.007.

ARAÚJO, H.D.A.; SILVA, L.R.S.; SIQUEIRA, W.N.; FONSECA, C.S.M.; SILVA, N.H.; MELO, A.M.M.A.; MARTINS, M.C.B.; LIMA, V.L.M. Dataset on usnic acid from *Cladonia substellata* Vainio (Lichen) *Schistosomiasis mansoni* vector control and environmental toxicity. **Data Brief**, v. 17, p. 228-291, 2018b. Doi:10.1016/j.dib.2017.12.068.

ARAÚJO, H. D. A.; MELO, A. M. M. A.; SIQUEIRA, W. N.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A. L.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; SILVA, N. H.; LIMA, V. L. M. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Trop.** 188, 132-137, 2018c. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.08.006.

ARAUJO-MELO, R.O.; SOUZA, I.F.A.C.; OLIVEIRA, C.V.J.; ARAUJO, J.M.; SENA, K.X.F.R.; COELHO, L.C.B.B. Isolation and identification of endophyte microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves, mainly actinobacteria. **Biotechnology Journal International**. v. 17, p. 1-12, 2017.

ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; ARREGUÍN-LOZANO, B. Biochemical Properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. **International Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 33-36, 1997.

ARGOLO, A.C.C.; SANTANA, A.E.G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Tecnology**, v. 95, p. 229-233, 2004.

AVDESH, A.; CHEN, M.; MARTIN-IVERSON, M.T.; MONDAL, A.; ONG, D.; SMITH, S.R.; TADDEI, K.; LARDELLI, M.; GROTH, D.M.; VERDILE, G.; MARTINS, R. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) **Laboratory: An Introduction. Journal of Visualized Experiments**, v. 69, p. 1-8, 2012. Doi:10.3791/4196.

BABÁL, P.; PINDAK, F.F.; RUSSELL, L.C.; GARDNER, W.A. JR. Sialic acid-specific lectin from *Tritrichomonas foetus*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1428, p. 106-116, 1999. Doi:10.1016/s0304-4165(99)00062-8.

BARBOSA, E.J.; LOBENBERG, R.; ARAUJO, G.L.B.; CHACRA, N.A. Niclosamide repositioning for treating cancer: Challenges and nano-based drug delivery opportunities. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 141, p. 58-69, 2019. Doi:10.1016/j.ejpb.2019.05.004.

BARBOSA, C.S.; GOMES, E.C.S.; CAMPOS, J.V.; OLIVEIRA, F.J.M.; MESQUISTA, M.C.S.; OLIVEIRA, E.C.A.; DOMINGUES, A.L.C. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta Trop.** v. 164, p. 10-16, 2016. Doi:10.1016/j.actatropica.2016.06.024.

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, p. 436-445, 2014.

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, p. 549-554, 2010. Doi:10.1590/S0074-02762010000400034.

BARRETO, A. V. M. S.; MELO, N. D.; VENTURA, J. V. T.; SANTIAGO, R. T.; SILVA, M. B. A. Analysis of Schistosomiasis mansoni positivity in endemic health regions in the State of Pernambuco, Brazil, 2005-2010. **Epidem. Servi. Saúde**. 24, 87-96, 2015. Doi: 10.5123/S1679-49742015000100010.

BASTOS, O. C.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A.; PIEDRABUENA, A. E. Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Rio Paraíba do Sul, S. Paulo — Brasil. **Rev. Saúde públ.**, v. 12, p. 184-99. 1978.

BATISTA, J.J.; ARAÚJO, H.D.A.; AGUIAR, T.W.A.; FERREIRA, S.A.O.; LIMA, M.V.; PEREIRA, D.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; MELO, A.M.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A.L.; COELHO, L.C.B.B. Toxic, cytotoxic and

genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 – intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. **Acta Trop.** v. 228, p. 106312, 2022. Doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2022.106312.

BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: a multifaceted tool for chemical biologists. **Chem Rev.** v. 113, p. e7952-80, 2013. Doi: 10.1021/cr4000013.

BEZERRA, F.S.M.; PINHEIRO, M.C.C.; SILVA FILHO, J.D.; CASTRO, I.M.N.; CALDEIRA, R.L.; SOUSA, M.S.; CAVALCANTE, A.B.; RAMOS JÚNIOR, A.N. Identification of *Biomphalaria* sp. and other freshwater snails in the large-scale water transposition project in the Northeast of Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, p. 1-10, 2018. Doi:10.1590/s1678-9946201860041.

BHOWAL, J.; GUHIA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1973-1982, 2005.

BLANTON R. Population Structure and Dynamics of Helminthic Infection: Schistosomiasis. **Microbiol Spectrum**, v. 7, p. 4, 2019.

BÖCKELMANN, U.; SZEWZYK, U.; GROHMANN, E. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 202-211, 2003.

BOGITSH, B.J.; CARTER, C.E.; OELTMANN, T.N. General characteristics of the trematoda. **Human Parasitology**, v. 9, p. 149–174, 2019. Doi:10.1016/b978-0-12-813712-3.00009-6.

BORGES, F.I.; MENDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Bauhinia monandra* Kurz. (Leguminosae-caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 24-32, 2009.

BOYD, W.C.; SAHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins lectins). **Science**, Washington, v.119, p. 419, 1954.

BRAGA, L. B. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): **avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**. 2012. 70 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. 2º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo, patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

BURGOS-ACEVES, M.A.; FAGGIO, C. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects. **Fish Shellfish Immunol**, v. 67, p. 513–517, 2017. Doi:10.1016/j.fsi.2017.06.042.

BUSTINDUY, A.L.; KING, C.H. Schistosomiasis. Manson's Tropical Infectious Diseases, v. 52, p. 698-725, 2014. Doi:10.1016/B978-0-7020-5101-2.00053-4

CAGLIARI, R.; KREMER, F.S.; PINTO, L. D. S. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 19, p. 811-820, 2018. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156.

CAMPOS, Y. R.; CARVALHO, O. S.; GOVEIA, C. O.; ROMANHA, A. J. Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) assed by SSR-PCR. **Acta trop.** v. 83, p. 19-27, 2002.

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, p. 93- 121, 1969.

CASTILLO, M.G.; HUMPHRIES, J.E.; MOURÃO, M.M.; MARQUEZ, J.; GONZALEZ, A.; MONTELONGO, C.E. *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 104, p. 103557, 2019. Doi:10.1016/j.dci.2019.103557.

CAVALCANTI, M.G.; FILHO, F.C.; MENDONÇA, A.M.; DUARTE, G.R.; BARBOSA, C.C.G.S.; DE CASTRO, C.M.M.B.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, p. 285-291, 2012. doi:10.1016/j.micron.2011.09.002

CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS. Parasites – Schistosomiasis – Biology. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>> Acesso em: 19. ago. 2022.

CHANG, Y.; LEE, W.Y.; LIN, Y.J.; HSU, T. Mercury (II) impairs nucleotide excision repair (NER) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos by targeting primarily at the stage of DNA incision. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 97–104, 2017. Doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.001.

CHEN, W.; MOOK, R.; PREMONT, R.T.; WANG, J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. **Cellular Signalling**, v. 41, p. 89-96, 2018. Doi:10.1016/j.cellsig.2017.04.001.

CHEN, C.; RATCLIFFE, E.; ROWLEY, A.F. Detection, isolation and characterization of multiplex lectins from the hemolymph of the cockroach *Blaberus discodalis*. **Journal of Biochemistry**, v. 294, p. 181-190, 1999.

CHUAH, C.; GOBERT, G.N.; LATIF, B.; HEO, C.C.; LEOW, C.Y. Schistosomiasis in Malaysia: A review. **Acta Trop.** v. 190, p. 137-143, 2019. Doi:10.1016/j.actatropica.2018.11.012

CLARK, T. E.; APPLETON, C. C.; DREWES, S. E. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides - a South African application. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 1-13, 1997.

CLEARY, J. A.; TILLITT, D. E.; VOM SAAL, F. S.; NICKS, D. K.; CLAUNCH, R. A.; BHANDARI, R. K. Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Pollution**. v. 251, p. 639–650, 2019.

COELHO, L.F. *Schistosoma mansoni* em: Atlas Virtual de Parasitologia. MiP, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal Fluminense, 2021. Disponível em: <<http://atlasparasitologia.sites.uff.br/?p=10121>>

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem. Anal.** v. 11, p. 295-300, 2000. Doi: 10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<295::AID-PCA517>3.0.CO;2-S.

COIMBRA-JUNIOR, C.E.A. Suscetibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* do Distrito Federal, Brasil. **Rev. Saúde públ.** v.15, p. 485-9, 1981.

COLLEY, D.G.; SECOR, W.E. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, v. 36, p. 347–357, 2014. Doi:10.1111/pim.12087.

COSTA, S.R.; VELASQUES, R.R.; HOFF, M.; SOUZA, M.M.; SANDRINI, J.Z. Characterization of different DNA repair pathways in hepatic cells of Zebrafish (*Danio rerio*). **DNA repair**, v. 83, p. 102695, 2019. Doi:10.1016/j.dnarep.2019.102695.

COSTA, A. D.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish Development and Genetics: Introducing in a Large Introductory Laboratory Class. **ZEBRAFISH**, v. 6, p. 169–177, 2014.

CRIEL, G.R.J.; MACRAE, T.H. (2002) *Artemia* morphology and structure. **Artemia: Basic and Applied Biology**, v. 1, p. 1-37, 2002. Doi:10.1007/978-94-017-0791-6.

DAI, Y.J.; JIA, Y.F.; CHEN, N.; BIAN, W.P.; LI, Q.K.; MA, Y.B.; CHEN, Y.L.; PEI, D.S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 11-17, 2014. Doi:10.1002/etc.2406.

DANABAS, D.; ATES, M.; TASTAN, B.E.; CIMEN, I.C.C.; UNAL, I.; AKSU, O.; KUTLU, B. Effects of Zn and ZnO nanoparticles on *Artemia salina* and *Daphnia magna* Organisms: Toxicity, accumulation and elimination. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134869, 2020. Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134869.

DE OLIVEIRA, E.C.A.; DA SILVA, I.E.P.; FERREIRA, R.J.; GUIMARÃES, R.J.P.S.E.; GOMES, E.C.S.; BARBOSA, C.S. Mapping the risk for transmission of urban schistosomiasis in the Brazilian Northeast. **Geospat Health**. v. 15, p. 11, 2020.

DEJONG, R.J.; MORGAN, J.A.; PARAENSE, W.L.; et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Mol Biol Evol**. v. 18, p. 2225-2239, 2001. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003769.

DHONT, J.; DIERCKENS, K.; STOTTRUP, J.; VAN STAPPEN, G.; WILLE, M.; SORGELOOS, P. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. **Advances in Aquaculture Hatchery Technology**, v. 5, p. 157-202, 2013. Doi:10.1533/9780857097460.1.157.

D' COSTA, A.; SHEPHERD, I. Zebrafish development and genetics: Introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish in Education**, v. 6, p. 169-177, 2009. Doi:10.1089=zeb.2008.0562.

ENGLER, A. Syllabus der pflanzenfamiliem. Gebrüder Borntraeger, v.2, p. 49, 1964.

EVANS, W.C. Pesticides of natural origin. Trease and Evans' Pharmacognosy, v. 40, p. 533-536, 2009. Doi:10.1016/B978-0-7020-2933-2.00040-X.

FACCHINI, L.A.; TOMASI, E.; DILELIO, A.S. Qualidade da Atenção Primária à Saúde no Brasil: avanços, desafios e perspectivas. **Saúde debate**, v. 42, p. 208-223, 2018. Doi: 10.1590/0103-11042018S114.

FARIA, R.X.; ROCHA, L.M.; SOUZA, E.P.B.S.S.; ALMEIDA, F.B.; FERNANDES, C.P.; SANTOS, J.A.A. Molluscicidal activity of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard on

Biomphalaria glabrata (Say, 1818). **Acta Trop.** v. 178, p. 163-168, 2018. Doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.012.

FERNANDES, A.J; FERREIRA, M.R.; RANDAU, K.P.; DE SOUZA, T.P.; SOARES, L.A. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **ScientificWorldJournal**, p. e923462, 2012. Doi:10.1100/2012/923462.

GAJARDO, G.M.; BEARDMORE, J.A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-8, 2012. Doi:10.3389/fphys.2012.00185.

GIANNACCINI, M.; CUSCHIERI, A.; DENTE, L.; RAFA, V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 10, p. 703-709, 2014. Doi:10.1016/j.nano.2013.09.010.

GONÇALVES, Í.F.S.; SOUZA, T.M.; VIEIRA, L.R.; et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environ Sci Pollut Res.** p. 10185–10204, 2020.

GONÇALVES, F.; COUTINHO, A.; SANTANA, W.; BARBOSA, C. Esquistossomose aguda, de caráter episódico, na ilha de Itamaracá, estado de Pernambuco. **Cad Saúde Pública**, v. 7, p. 424-5, 1991.

GOMES, E.C.S.; LEAL-NETO, O.B.; ALBUQUERQUE, J.; SILVA, H.P.; BARBOSA, C.S. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco. Brazil. **Int J Health Geogr.** v. 11, p. 1-11, 2012.

GORE, A.V.; MONZO, K.; CHA, Y.R.; PAN, W.; WEINSTEIN, B.M. Vascular development in the zebrafish. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, p. 1-21, 2012. Doi:10.1101/cshperspect.a006684.

GRAEBING, P.W.; CHIB, J.S.; HUBERT, T.D.; GINGERICH, W.H. Gingerich Metabolism of niclosamide in sediment and water systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5924-5932, 2004. Doi:10.1021 / jf0401524.

GUYON, J.R.; STEFFEN, L.S.; HOWELL, M.H.; PUSACK, T.J.; LAWRENCE, C.; KUNKEL, L.M. Modeling human muscle disease in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 205-215, 2007. Doi:10.1016/j.bbadis.2006.07.003.

HABIB, M.R.; SHAN, L.V.; ROLLINSON, D.; ZHOU, X. Invasion and dispersal of *Biomphalaria* species: Increased vigilance needed to prevent the introduction and spread of schistosomiasis. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1-16, 2021. Doi:10.3389/fmed.2021.614797.

HAMILTON, F. An Account of the fishes found in the river ganges and its branches. Constable & Robinson Ltd.; Edinburgh, UK: 1822.

HAYER, N.J. Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgG anti-lectina de folha de *Bauhinia monandra*. Tese (Doutorado – Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**. v. 752, p. 207-216, 2001. Doi:10.1016/s0378-4347(00)00564-8.

HUANG, Q.; YU, M.; CHEN, H.; ZENG, M.; SUN, Y.; SAHA, T.T.; CHEN, D. LRFN (leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein) recognizes bacteria and promotes hemocytic phagocytosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 72, p. 622–628, 2018. Doi:10.1016/j.fsi.2017.11.049.

IRYANI, M.T.M.; SORGELOOS, P.; DANIEL, M.D.; TAN, M.P.; WONG, L.L.; MOK, W.J.; SATYANTINI, W.H.; MAHASRI, G.; SUNG, Y.Y. Cyst viability and stress tolerance upon heat shock protein 70 knockdown in the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, p. 1099-1103, 2020. Doi:10.1007/s12192-020-01113-0.

ISKRATSCHE, T.; BRAUN, A.; PASCHINGER, K.; WILSON, I.B.H. Specificity analyses of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, p. 133-146, 2009.

JANKOVIC, M.; GOLUBOVIC, S. 200 kDa glycoprotein isolated from breast cancer tissue: a putative ligand for galectin-1. **Archive of Oncology**, v. 8, p. 39-43, 2000.

JOHNSTON, L.A.; YOSHINO, T.P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 786-793, 2001. Doi:10.1645/0022-3395(2001)087[0786:LSMESG]2.0.CO;2.

JPETS. Artemia de água doce em: Branchonetas.2014. Disponível em: < <http://jpets-blog.blogspot.com/2014/08/artemia-de-agua-doce-branchonetas.html>>

KALINDA, C.; CHIMBARI, M.; MUKARATIRWA, S. Implications of changing temperatures on the growth, fecundity and survival of intermediate host snails of schistosomiasis: A systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 2-18, 2017. Doi:10.3390/ijerph14010080.

KALUEFF, A.V.; STEWART, A.M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, p. 63- 75, 2014. Doi:10.1016/j.tips.2013.12.002

KANUNGO, J.; CUEVAS, E.; ALI, S.F.; PAULE, M.G. Zebrafish model in drug safety assessment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 5416-5429, 2014. Doi: 10.2174/1381612820666140205145658.

KAMEL, B.; LAIDEMITT, M.R.; LU, L.; BABBITT, C.; WEINBAUM, O.L.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S. Detecting and identifying *Schistosoma* infections in snails and aquatic habitats: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, p. e0009175, 2021. Doi:10.1371/journal.pntd.0009175.

KATZ, N., 2018. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, CPqRR.

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, p. 347-391, 2008.

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

KENNEDY, J.F; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTE, M.S.M; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

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

KILPATRICK, D.C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, p. 55-65, 1999.

KLOOS, H.; MCCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. **Planta Medica**, v. 46, p. 195-209, 1982.

KNAUT, J.L. **Avaliação do efeito citotóxico de lectinas extraídas de leguminosas sobre células de glioma C6**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências. Florianópolis, SC, 2016.

KUMAR, P.; SINGH, D. K. Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea cuminata*. *Chemosphere*, v. 63, 1568–574, 2006.

LADHAR-CHAABOUNI, R.; HAMZA-CHAFFAAI, A. The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1669-1685, 2016. Doi:10.1007/s10616-015-9932-3.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007. Doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.

LIESCHKE, G.J.; OATES, A.C.; CROWHURST, M.O.; WARD, A.C.; LAYTON, J.E. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. **Blood**, v. 98, p. 3087-3096, 2001. Doi:10.1182/blood.v98.10.3087.

LIU, Y.T.; WANG, F.H.; AI, X.H.; WANG, Z.Y.; YANG, Q.H.; XU, N. Residue depletion and risk assessment of niclosamide in three species of freshwater fish. **Food Addit & Contam. Part A**, v. 35, p. 1497-1507, 2018. Doi:10.1080/19440049.2018.1488184.

LIU, Y.T.; AI, X.H.; WANG, F.H.; SUO, W.W.; YANG, Q.W.; YANG, H.; XU, N. Determination of niclosamide in aquatic animal tissue by a novel extraction procedure and high-performance liquid chromatography–heated electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Analytical Letters**, v. 48, p. 929-943, 2015. Doi:10.1080/00032719.2014.968931.

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. Doi:10.1016/j.jep.2004.10.004.

LUO, C.; HUANG, Y.; HUANG, D.; LIU, M.; XIONG, W.; GUO, Q.; YANG, T. Migration and transformation characteristics of niclosamide in a soil–plant system. **ACS Omega**, v. 3, p. 2312-2331, 2018. Doi:10.1021/acsomega.8b00071.

LEWIS, G.P. Legumes of Bahia. **Kew Botanic Gardens**, 369, 1987.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D.; KAWANO, T. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia**, v. 95, n. 2, p. 213-16, 2005.

LOCKYER, A.E.; SPINKS, J.; KANE, R.A.; HOFFMANN, K.F.; FITZPATRICK, J.M.; ROLLINSON, D.; NOBLE, L.R.; JONES, C.S. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in

haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. BMC Genomics, v. 9, p. 1- 17, 2008. Doi:10.1186/1471-2164-9-634.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S.A.; ASSIS, J.C.A.; DRAGO, F.B.; MELO, A.L.; RABELO, E.M.L.; PINTO, H.A. Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. **Acta Trop.** v. 199, p. 2-11, 2019. Doi:10.1016/j.actatropica.2019.105082

LOPES, T.A.; NOBUSHIGE, S.Y.L.; SILVA, A.P.S.; GOVEIA, C.O.; ENK, M.J.; SAMPAIO, I.; SALES, J.B.L.; FILHO, L.F.S.R. Distribution and identification of the genus *Biomphalaria preston* (1910): important insights into the epidemiology of schistosomiasis in the Amazon region. **Revista de Biologia**, v. 17, p. 31-37, 2017. Doi:10.7594/revbio.17.02.06.

LUO, Y.; XU, X.; LIU, J.; LO, J.; SUN, Y.; LIU, Z.; LIU, J.; VAN DAMME, E.; BALZARINI, J.; BAO, J. A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne (family *Araceae*) with antiviral activity against HSV-II and antiproliferative effect on human cancer cell lines. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 358-367, 2007.

MA, W.M.; LI, H.W.; DAI, Z.M.; YANG, J.S.; YANG, F.; YANG, W.J. Chitin-binding proteins of *Artemia* diapause cysts participate in formation of the embryonic cuticle layer of cyst shells. **Biochemical Journal**, v. 449, p. 285-294, 2013. Doi:10.1042/BJ20121259.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) Against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 486-498, 2007.

MACHALOWSKI, T.; JESIONOWSKI, T. Hemolymph of molluscan origin: from biochemistry to modern biomaterials science. **Applied Physic**, v. 127, p. 3-22, 2021. Doi:10.1007/s00339-020-04166-1.

MADHAV, M.R.; DAVID, E.M.; KUMAR, R.S.S.; SWATHY, J.S.; BHUVANESHWARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Toxicity and accumulation of Copper

oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 227-238, 2017. Doi:10.1016/j.etap.2017.03.013.

MAGUIRE, J.H. Trematodes (Schistosomes and liver, intestinal, and lung flukes). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, v. 290, p. 3216–3226, 2015. Doi:10.1016/b978-1-4557-4801-3.00290-3.

MARDEN, B.; BROWN, P.; BOSTEELS, T. Great salt lake *Artemia*: Ecosystem functions and services with global reach. **Great Salt Lake Biology**, v. 7, p. 175-237, 2020. Doi:10.1007/978-3-030-40352-2_7.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 639-52, 1985.

MARTINS, M.; SILVA, A.; COSTA, M.H.; MIGUEL, C.; COSTA, P.M. Co-exposure to environmental carcinogens in vivo induces neoplasia-related hallmarks in low-genotoxicity events, even after removal of insult. **Science Reports**, v. 8, p. 1-11, 2018. Doi:10.1038/s41598-018-21975-w.

MARTINS, E.R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais, Viçosa, Minas Gerais: UFV, **Imprensa Universitária**, 1995.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

MCCUNE, L.M.; JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plantas associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. **Journal Ethnopharmacol**, v. 82, p. 197-205, 2002.

McMANUS, D.P.; BERGQUIST, R.; CAI, P.; RANASINGHE, S.; TEBEJE, B.M.; YOU, H. Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, p. 1-17, 2020. Doi:10.1007/s00281-020-00789-x

MECKELENBURG, M.; AVITEL, J.; WINQUIST, F.; GANG, J.; ORNSTEIN, K.; DEY, E.; BIN, X.; HEDBORG, E.; NORRBY, R.; AEWIN, H.; LUUNDTROM, I.; DANIELSSON, B. Differentiation of human sérum samples by surface plasmon resonance monitoring of the integral glycoprotein interaction with a lectin panel. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 25-31, 2002.

MELO, A.O.; SANTOS, D.B.; SILVA, L.D.; ROCHA, T.L.; BEZERRA, J.C.B. Molluscicidal activity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Chemosphere**, v. 216, p. 365-371, 2019. Doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.035.

MELO, C.M.L.; PORTO, C.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MENDES, C.M.; CAVALCANTI, C.C.; COELHO, L.C.; PORTO, A.L.; LEÃO, A.N.; CORREIA, M.T. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int J Pharm.** v. 408, p. 113-119, 2011. Doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.011.

MONTE, T.C.C.; CHOMENTON, T.Q.; BERTHO, A.L.; MOURA, V.S.; VASCOSELLOS, M.C.; GARCIA, J.; FERRZA-NOGUEIRA, R.; JÚNIOR, A.M.; FARO, M.J. Changes in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *Echinostoma paraensei* and exposed to glyphosate-based herbicide. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 160, p. 67-75, 2019. Doi:10.1016/j.jip.2018.11.007.

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Schistosoma mansoni and Biomphalaria: past history and future trends. **Parasitology (in press)**, v. 123, p. 211-28, 2001. Doi: 10.1017/s0031182001007703.

MOUAHID, G.; ROGNON, A.; AUGUSTO, R.C.; DRIGUEZ, P.; GEYER, K.; KARINSHAK, S.; LUVIANO, N.; MANN, V.; QUACK, T.; RAWLINSON, K.; WENDT, G.; GRUNAU, C.; MONÉ, H. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 1-8, 2018. Doi:10.12688/wellcomeopenres.13488.1.

MUNTEANU, C. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, v. 2, p. 119-122, 2011.

NAKANO, E.; WATANABE, L.C.; OHLWEILER, F.P.; PEREIRA, C.A.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, v. 536, p. 145-154, 2003. Doi:10.1016/s1383-5718(03)00042-1.

NATION, C.S.; DA'DARA, A.A.; MARCHANT, J.K.; SKELLY, P.J. Schistosome migration in the definitive host. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, p. 1-12, 2020. Doi:10.1371/journal.pntd.0007951.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13. Ed. São Paulo: Atheneu; 2016.

NOYA, O., KATZ, N., POINTIER, J.P., THERON, A., NOYA, B.A. Schistosomiasis in America. In: Franco-Paredes, C., Santos-Preciado, J.I. Neglected Tropical Diseases: Latin America and the Caribbean. Springer-Verlag Wien, pp. 11–44, 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. Doi:10.1016/j.envpol.2005.12.037.

NWORIE, K.M.; OKORIE, N.A. Phytochemicals distribution and antioxidant potential of *Bauhinia monandra* (Linn.) leaves extract. **Research Journal of Medicinal Plants**. v. 12, n. 2, p. 78-83, 2018.

OLIVEIRA, W. F.; SANTOS, N. R. M.; CABRERA, M. P.; FERREIRA, S. A. O.; RAPOSO, B. L.; NAPOLEAO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CABRAL FILHO, P. E.; FONTES, A.; CORREIA, M. T. S. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cell. **Methods Appl. Fluoresc.** v. 8, p. 7, 2020. Doi: 10.1088/2050-6120/ab9694.

OLIVEIRA, E.C.A.; SILVA, I.E.P.; FERREIRA, R.J.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; GOMES, E.C.S.; BARBOSA, C.S. Mapping the risk for transmission of urban schistosomiasis in the Brazilian northeast. **Geospatial Health**, v. 15, p. 371-381, 2020b. Doi:10.4081/gh.2020.861.

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

OHLWEILER, F.P.; ROSSIGNOLI, T.J.; PALASIO, R.G.S.; TUAN, R. Taxonomic diversity of *Biomphalaria* (Planorbidae) in São Paulo state, Brazil. **Biota Neotrop**, v. 20, p. 2-15, 2020. Doi:10.1590/1676-0611-BN-2020-0975.

PACHECO, G.KN.; MALDONADO, N.S.S.; ALTA, R.Y.P.; VITORIANO, H.A. Short exposure of *Artemia salina* to group-12 metals: Comparing hatchability, mortality, lipid peroxidation, and swimming speed. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 2-9, 2021. Doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112052.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. (ed), Current Research, Technology and Education

PARAENSE, W.L. Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose uma Visão Multidisciplinar. Editora FIOCRUZ. Rio de Janeiro. p. 285- 308, 2008.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 – 2018**. 2. Ed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2015. 46p. 2017.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria executiva de vigilância em saúde/ SES – PE. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2011 – 2014**. 2. Ed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2013.29p, 2014.

PEREIRA, D.S.T.; LIMA-RIBEIRO, M.H.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C.D.E.L.; DE PONTES-FILHO, N.T.; COELHO, L.C.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.;

CORREIA, M.T. Tropical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 11, 2012.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** v. 109, p. 347-352, 1995. Doi:10.1104/pp.109.2.347.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: **The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2, (Wu A. M. ed)**, p. 27-54. Kluwer Academic, 2001.

PINTO, C.; ALMEIDA, A.F. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 40, p. 291-311, 1944.

PILA, E.A.; LI, H.; HAMBROOK, J.R.; WU, X.; HANINGTON, P.C. Schistosomiasis from a snail's perspective: Advances in snail immunity. **Trends in parasitology**, v. 33, p. 845–857, 2017. Doi:10.1016/j.pt.2017.07.006.

PILA, E.A.; SULLIVAN, J.T.; WU, X.Z.; FANG, J.; RUDKO, S.P.; GORDY, M.A.; HANINGTON, P.C. Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 119-228, 2016. Doi:10.1016/j.dci.2015.11.010.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 23, p. 20, 2015. Doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x.

RAMOS, S.A.F.; SILVA, L.C.N.; CORREIA, M.T.S.; ARAÚJO, J. M.; COELHO, L.C.B.B. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research**. v. 10, p. 600-607, 2016.

RAPADO, L.N.; DE SÁ PINHEIRO, A.; LOPES, P.O.D.M.V.; FOKOUE, H.H.; SCOTTI, M.T.; MARQUES, J.V.; NAKANO, E. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, p. 2251, 2013.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Science**, v.139, p. 141-148, 1998.

REY, O.; WEBSTER, B.L.; HUYSE, T.; ROLLINSON, D.; VAN DEN BROECK, F.; KINCAID-SMITH, J.; ONYEKWERE, A.; BOISSIER, J. Population genetics of African *Schistosoma* species. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104727, 2021. Doi:10.1016/j.meegid.2021.104727.

RIBEIRO, E.C.G.; LEITE, J.A.C.; LUZ, T.R.S.A.; SILVEIRA, D.P.B.; BEZERRA, S.A.; FRAZÃO, G.C.C.G.; PEREIRA, L.P.L.; SANTOS, E.G.G.; FILHO, P.R.F.R.; SOARES, A.M.S.; SANTOS, R.L.; COUTINHO, D.F. Molluscicidal activity of monoterpenes and their effects on inhibition of acetylcholinesterase activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.** v. 223, p. 106089, 2021a. Doi:10.1016/j.actatropica.2021.106089.

RIBEIRO, I.A.T.A.; SÁ, J.L.F., LIMA, M.V.; VERAS, S.T.S.; AGUIAR, J.C.R.O.F.; AIRES, A.L.; AL-BUQUERQUE, M.C.P.A.; SILVA, M.V.; MELO, A.M.M.A.; NAVARRO, D.M.A.F.; CORREIA, M.T.S. Toxic effect of *Croton rudolphianus* leaf essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae and *Artemia salina*. **Acta Trop.** v. 223, p. 106102, 2021b. Doi:10.1016/j.actatropica.2021.10

ROCHA-FILHO, C.A.A.; ALBUQUERQUE, L.P.; SILVA, L.R.S.; SILVA, P.C.B.; COELHO, L.C.C.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.

ROSILIO, V.; BOISSONNADE, M.; COELHO, L.C.B.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; ANDRADE, C.A.S.; BASZKIN, A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. **Colloids and Surfaces A**, p. 491-497, 2004

RUDIGER, H.; SIEBERT, H.C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARRETO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.H.; DIAZ-MARINO, T.; GABIOS, H.J. Medical chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

SÁ, J.L.F.; SIQUEIRA, W.N.; SILVA, H.A.M.F.; SANTOS, M.L.O.; SANTOS, F.T.J.; SILVA, L.R.S.; CABRAL, D.L.V.; BEZERRA, I.C.F.; SOARES, L.A.L.; MELO, A.M.M.A. Evaluation of molluscicidal activity of *Anadenanthera colubrine* extracts on adult mollusc and embryos of the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Scientia plena**, v. 12, p. 2-9, 2016. Doi:10.14808/sci.plena.2016.101001.

SÁ, R.A.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; GUSMÃO, N.B.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; BIEBER, L.W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009.

SANTANA, G.M.S.; ALBUQUERQUE, L.P.; PONTUAL, E.V.; SILVA, L.R.S.; AGUIAR, J.S.; SILVA, T.G.; MELO, A.M.M.A.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Evaluation of the molluscicidal, artemicidal and cytotoxic activities of the Lectin from *Opuntia ficus-indica* Cladodes (OfiL). **Asian Journal of Research in Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2020. Doi: 10.9734/AJRB/2020/v6i330116.

SANTORIELLO, C.; ZON, L.I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 2337-2343, 2012. Doi:10.1172/JCI60434.

SANTOS, M.B.; DOS SANTOS, A.D.; DA SILVA, P.P.; BARRETO, A.S.; SANTOS, E.O.; FRANÇA, A.V.C.; BARBOSA, C.S.; ARAÚJO, K.C.G.M. Spatial analysis of viral hepatitis and schistosomiasis coinfection in an endemic area in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 383-387, 2017. Doi:10.1590/0037-8682-0411-2016.

SANTOS, A.F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; BEZERRA, R.F.; CARVALHO, E.V.M.M.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. **Advances in Medicine and Biology**, v. 63, p. 33-60, 2013.

SAMPIETRO, A. R.; ISLA, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. fruits. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 160, p. 659–667, 2001. Doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00442-8.

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. **Geospat. Health**. v.6, p.95-101, 2012. Doi: 10.4081/gh.2012.127.

SCHULTZ, J.H.; ADEMA, C.M. Comparative Immunogenomics of molluscs. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 75, p. 3-15, 2017. Doi:10.1016/j.dci.2017.03.013.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P.G. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the host: Granuloma formation and egg excretion. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1-16, 2018. Doi:10.3389/fimmu.2018.02492.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO. **Vigilância e controle da esquistossomose, geohelmintíases e filariose**. Recife: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, 2014.

SELLAMI, I.; NACEUS, H.B.; KACEM, A. Reproductive performance in successive generations of the brine shrimp *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) from the Sebkha of Sidi El Hani (Tunisia). **Animal Reproduction Science**, v. 225, p. 106692, 2021. Doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106692.

SHAKER, Y.; SAMY, N.; ASHOUR, E. Hepatobiliary Schistosomiasis. **J Clin Transl Hepatol**, v. 2, p. 212-216, 2014. Doi: 10.14218/JCTH.2014.00018

SILVA, Y.R.R.; SILVA, L.D.; ROCHA, T.L.; SANTOS, D.B.; BEZERRA, J.C.B.; MACHADO, K.B.; PAULA, J.M.; AMARAL, V.C.S. Molluscicidal activity of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) stem bark ethanolic extract against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): a novel plant-derived molluscicide?. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p. 2-16, 2020a. Doi:10.1590/0001-37652020200715.

SILVA, H.A.M.F.; AIRES, A.L.; SOARES, C.L.R.; SÁ, J.L.F.; MARTINS, M.C.B.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; SILVA, T.G.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C.; MELO, A.M.M.A.; SILVA, N.H. Barbatic acid from *Cladia aggregata* (lichen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Toxicology in vitro*, v. 65, p. 2-10, 2020b. Doi:10.1016/j.tiv.2020.104771.

SILVA, F.C.O.; MENEZES, J.E.S.A.; FERREIRA, M.K.A.; SILVA, A.W.; HOLANDA, C.L.A.; LIMA, J.R.; CAMPOS, A.R.; EVARISTO, F.F.V.; TEIXEIRA, E.H.; MAGALHÕES, F.E.A.; BANDEIRA, P.N.; SANTOS, H.S. Antinociceptive activity of 3 β -6 β -16 β trihydroxylup-20 (29)-ene triterpene isolated from *Combretum leprosum* leaves in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 533, p. 362-367, 2020c. Doi: 10.1016/j.bbrc.2020.07.107

SILVA, K.L.; CECHINEL, FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449-454, 2002.

SILVA-FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 919-23, 2009.

SIQUEIRA, W.N.; FRANÇA, E.J.; PEREIRA, D.R.; VASCONCELOS LIMA, M.; SILVA, H.A.M.F.; ARAÚJO, H.D.A.; SÁ, J.L.F.; MELO, A.M.M.A. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, v. 249, p. 2-8, 2020. Doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126218.

SINGH, A.; SINH, D. K.; MISRA, T. N.; AGARWAL, R. A. Molluscicides of plant origin. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 13, p. 205-52, 1996.

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S. A novel mitogenic and aniproliferative lectin from wild cobra lily, *Aeisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, p. 1057-1065, 2004.

SISSENANDO, H.A.A.A.C.N.; MACEDO, M.F.S.; SATURNINI, A.C.R.D.; COELHO, L.C.B.B.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.

SNEDDON, L.; HALSEY, L.G.; ENTERRAR, N.R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **Journal of Experimental Biology**, v. 1, p. 3007-3016, 2017. Doi:10.1242/jeb.147058.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA JUNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 9, p. 8, 2011.

STOWELL, S.R.; QIAN, Y.; KARMAKAR, S.; KOYAMA, N.S.; DIAS-BARUFFI, M.; LEFFLER, H.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Differential roles of galectin-1 and galactin-3 in regulating leukocyte viability and cytokina secretion. **Journal of immunology**, v. 180, p. 3091-3105, 2008.

SULTAN, N.A.M; SWAMY, M.J. Fluorescence quenching and time-resolved fluorescence studies on *Trichosanthes dioica* seed lectin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 80, p. 93-100, 2005.

SUZUKI, Y.; INOUE, T.; YOSHIMARU, T.RA.C. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1783, p. 924-934, 2008.

TALLARICO, L.F.; BORRELY, S.I.; HAMADA, N.; GRAZEFFE, V.S.; OHLWEILER, F.P.; OKAZAKI, K.; GRANATELLI, A.T.; PEREIRA, I.W.; PEREIRA, C.A.B.; NAKANO, E.

Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208-215, 2014. Doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.005.

TANG, S. S. H.; WHITFIELD, P. J.; PERRET, S. Activity of the molluscicidal plant *Milletia thonningii* (Leguminosae) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. **J. Parasitol.** v. 81, p. 833-835, 1995.

TATENO, H.; WINTER, H. C.; PETRYNIAK, J.; GOLDSTEIN, I. J. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Phlebodium aureum* (L) J. Smith (Polypodiaceae). **The Journal of biological chemistry**, v. 278, p. 10891–10899, 2003. Doi.org/10.1074/jbc.M211840200.

TIMOSHENKO, A.V.; LAN, Y.; GAIBUS, H.J.; LALA, P.K. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin on their combination: effects on tumor growth, capilar leakage and nitric oxide (NO) production. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 1910-1920, 2001.

VALLADARES, V.; PASQUINI, C.; THIENHO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; MELO-SILVA, C.C. Field application of NIR spectroscopy for the discrimination of the *Biomphalaria* Species that are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 1-8, 2021. Doi:10.3389/fpubh.2021.636206.

VIANEY-LIAUD, M.; DUSSART, G. Aspects of pairing and reproduction in the hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda:Pulmonata). **The 92 Macacological Society of London**, v. 68, p. 243-248, 2002. Doi:10.1093/mollus/68.3.243.

VIJAYAN, M.C.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

VINATEA, J.E. *Artemia* Um ser vivo excepcional. Panorama da Aquicultura. 25 Ed, 2018. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/artemia-um-ser-vivo-excepcional/>>

VINTHER, J. The origins of molluscs. **Palaeontology**, v. 58, p. 19–34. 2014. Doi:10.1111/pala.12140.

WANG, C.; JIA, H.; ZHU, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. **Science of The Total Environment**, v. 598, p. 847-855, 2017. Doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.183.

WEINSTEIN, B. Vascular cell biology in vivo: A new piscine paradigm? **Trends in Cell Biology**, v. 12, p. 439-445, 2002. Doi:10.1016/s0962-8924(02)02358-9.

WEN-MING, M.; HUA-WEL, L.; ZHONG-MIN, D.; JIN-SHU, Y.; YANG, F.; YANG, W.J. Chitin-binding proteins of *Artemia* diapause cysts participate in formation of the embryonic cuticle layer of cyst shells. **Biochemical Journal**, v. 449, p. 285-294, 2013. Doi:10.1042/BJ20121259.

WHO. World Health Organization. Epidemiology and control of schistosomiasis. World Health Organ Technical Report Serie 649: 1-76, 1980.

WHO. World Health Organization. 2017. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers. World Health Organization. 40. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254641>. ISBN: 9789241511995.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis#>> Acesso em: 19/10/2022

WIRBISKY, S.E.; WEBER, G.J.; SEPÚLVEDA, M.S.; LIN, T.L.; JANNASCH, A.S.; FREEMAN, J.L. An embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological alterations in their offspring. **Scientific Reports**. v. 6, p. 21337, 2016.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relationship between the pathogenicity of *Schistosoma mansoni* in mice and the susceptibility of the vector mollusc. I. Cercariae infectivity and worm burden. **Rev. Saúde públ.** v. 25, p. 359-66, 1991.

ZBINDEN, G. Predictive value of animal studies in toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 14, p. 167–177, 1991.

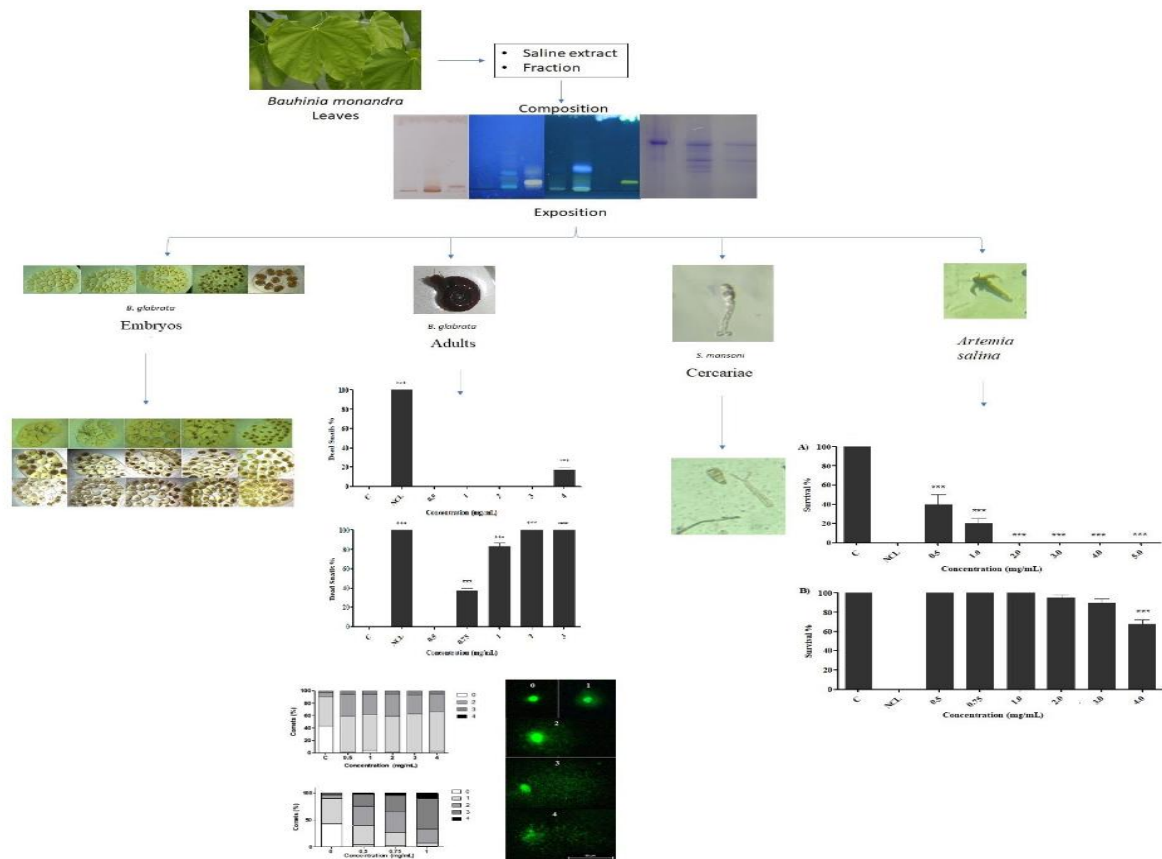
ZHANG, T.; PETERSON, R. T. Chapter 51 - Zebrafish as a Platform for Drug Screening. In S. C. Cartner, J. S. Eisen, S. C. Farmer, K. J. Guillemin, M. L. Kent, & G. E. Sanders (Eds.), *The Zebrafish in Biomedical Research*. p. 659–675, **Academic Press**, 2000.

ZHAO, S.; HUANG, J.; YE, J. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, p. 2-9, 2015. Doi: 10.1186/s13046-015-0196-8

ZHU, B.; HE, W.; YANG, F.; CHEN, L. High-throughput transcriptome sequencing reveals the developmental toxicity mechanisms of niclosamide in zebrafish embryo. **Chemosphere**, v. 244, p. 2-11, 2020. Doi:10.1016/j.chemosphere.2019.1254682.

5. ARTIGO - EFFECT OF *BAUHINIA MONANDRA* KURZ LEAF PREPARATIONS ON EMBRYONIC STAGES AND ADULT SNAILS OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818), *SCHISTOSOMA MANSONI* CERCARIAE AND TOXICITY IN *ARTEMIA SALINA*

RESUMO GRÁFICO



Fonte: Aguiar et al: (2022)

Article

Effect of *Bauhinia monandra* Kurz Leaf Preparations on Embryonic Stages and Adult Snails of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Schistosoma mansoni* Cercariae and Toxicity in *Artemia salina*

Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar ¹, José Josenildo Batista ¹, Silvio Assis de Oliveira Ferreira ¹, Máira de Vasconcelos Lima Sampaio ², Dewson Rocha Pereira ², Magda Rhayanny Assunção Ferreira ³, Luiz Alberto Lira Soares ³, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo ², Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque ^{4,5}, André de Lima Aires ^{4,5,*}, Hallysson Douglas Andrade de Araújo ^{1,5,*} and Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho ^{1,*}



Citation: Aguiar, T.W.d.A.; Batista, J.J.; Ferreira, S.A.d.O.; Sampaio, M.d.V.L.; Pereira, D.R.; Ferreira, M.R.A.; Soares, L.A.L.; Melo, A.M.M.d.A.; Albuquerque, M.C.P.d.A.; Aires, A.d.L.; et al. Effect of *Bauhinia monandra* Kurz Leaf Preparations on Embryonic Stages and Adult Snails of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Schistosoma mansoni* Cercariae and Toxicity in *Artemia salina*. *Molecules* **2022**, *27*, 4993. <https://doi.org/10.3390/molecules27154993>

Academic Editor: Thomas J. Schmidt

Received: 4 June 2022

Accepted: 29 July 2022

Published: 5 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Centro de Biotecnologias, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, n 1235, Recife 50670-420, PE, Brazil
 - ² Centro de Biotecnologias, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, n 1235, Recife 50670-420, PE, Brazil
 - ³ Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Arthur de Sá, Cidade Universitária, s/n, Recife 50740-521, PE, Brazil
 - ⁴ Centro de Ciências Médicas—Área Acadêmica de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, n 531-611, Recife 50670-901, PE, Brazil
 - ⁵ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, n 1235, Recife 50670-901, PE, Brazil
- * Correspondence: andre.laires@ufpe.br (A.d.L.A.); hallysson.douglas@ufpe.br (H.D.A.d.A.); luana.coelho@ufpe.br (L.C.B.B.C.)

Abstract: *Biomphalaria glabrata* snails constitute the main vector of schistosomiasis in Brazil, and *Bauhinia monandra* Kurz, the leaves of which contain BmoLL lectin with biocidal action, is a plant widely found on continents in which the disease is endemic. This work describes the composition of *B. monandra* preparations and the effect on embryos and adult snails, their reproduction parameters and hemocytes. We also describe the results of a comet assay after *B. glabrata* exposure to sublethal concentrations of the preparations. Additionally, the effects of the preparations on *S. mansoni* cercariae and environmental monitoring with *Artemia salina* are described. In the chemical evaluation, cinnamic, flavonoid and saponin derivatives were detected in the two preparations assessed, namely the saline extract and the fraction. Both preparations were toxic to embryos in the blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stages (LC₅₀ of 0.042 and 0.0478; 0.0417 and 0.0419; 0.0897 and 0.1582; 0.3734 and 0.0974; 0.397 and 0.0970 mg/mL, respectively) and to adult snails (LC₅₀ of 6.6 and 0.87 mg/mL, respectively), which were reproductively affected with decreased egg deposition. In blood cell analysis, characteristic cells for apoptosis, micronucleus and binucleation were detected, while for comet analysis, different degrees of nuclear damage were detected. The fraction was able to cause total mortality of the cercariae and did not present environmental toxicity. Therefore, *B. monandra* preparations are promising in combating schistosomiasis since they can control both the intermediate host and eliminate the infectious agent, besides being safe to the environment.

Keywords: embryotoxic effect; schistosomiasis; molluscicide potential; lectin; ecotoxicity

1. Introduction

Plants have been used as sources of raw material since prehistory; it is noticeable that in the last four decades there has been a resurgence of interest in the study and use of plant products [1,2]. According to the World Health Organization (WHO), approximately 85% of the world's entire population make use of plant extracts to solve problems directly related

to primary health care [3]; for example, the molluscicide activity of plants as a prophylactic alternative in the transmission of schistosomiasis [4–6].

Schistosomiasis, a parasitic infectious disease caused by parasites of the genus *Schistosoma* spp., affects more than 236 million people in 78 countries and territories worldwide [7]. In Brazil, the disease is endemic in 19 of 27 states, with an estimated 1.5 million infected, with the northeast being the main region affected, putting 25 million people at risk of infection. It is transmitted by mollusks of the genus *Biomphalaria* with *B. glabrata* being the main vector responsible for releasing thousands of cercariae daily into the aquatic environment; in three months, a single mollusk generates approximately 10 million new descendants [8–11].

The World Health Organization recommends the population control of mollusks with the application of the molluscicide niclosamide (Baylucide, Bayer®) only in localities with high prevalence of schistosomiasis, due to its high toxicity to non-target species, such as fish, plants and other organisms present in the aquatic ecosystem [12,13]. Thus, there is an urgent need for investment in research that can contribute to new molluscicide alternatives which are effective, biosafe and present high selectivity. This scenario encouraged our research group to study bioactive natural products in the population control of *B. glabrata* mollusks, their infectious agent (*S. mansoni* cercariae) and the evaluation of environmental ecotoxicity with reference bioindicators [14–16].

In this context, plants of the genus *Bauhinia* (Fabaceae family) are widely found on continents where endemic diseases for schistosomes are reported, such as Africa and Asia, as well as Central and South America [17]. In Brazil, *Bauhinia monandra* Kurz [18] is popularly known as “pata-de-vaca” and several of its biotechnological applications have already been reported [19,20]. For example, lectin, a protein that binds to galactose carbohydrate by specific and reversible recognition, was purified to homogeneity from the leaves of *B. monandra* (BmoLL, *B. monandra* leaf lectin) and presented insecticide activity against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) [21,22]. In addition, promising results were observed with endophytic isolated from the leaves of *B. monandra*, which showed fungicidal and bactericidal actions [23,24]. Regarding the toxicity parameter using the *Artemia salina* environmental bioindicator model, one of the most frequently used species for toxicity testing, BmoLL did not affect the survival of nauplii, not even at high concentrations of 250–1000 µg/mL [15]. Different organic extracts of leaves of *B. variegata* showed molluscicidal action against *Lymnaea acuminata* adults, the intermediate host of *Fasciola gigantica*, against which the ethanolic (LC₅₀ 14.4 mg/L in 96 h) and the fraction (LC₅₀ 20.3 mg/L) were the more effective [25]. Thus, these studies demonstrate that extracts and fractions of species of the genus *Bauhinia* are promising in the control of vectors, including snails, of importance in human and veterinary medicine.

This is the first study to explore the analysis of the composition of the saline extract and fraction of leaves of *B. monandra* and its molluscicidal action on different embryonic and adult stages of *B. glabrata*, as well as reproductive parameters (fecundity and fertility) and cytotoxicity and genotoxicity on hemocytes. Concurrently, the cercaricidal activity on *S. mansoni* (mobility/mortality), the infective evolutionary phase for the definitive host (man), and environmental safety using the bioindicator/non-target organism *Artemia salina* are explored.

2. Results and Discussion

2.1. Analysis of the Composition of Saline Extract and Fraction of *B. monandra* Were Assessed

The saline extract obtained from the suspension in NaCl 0.15 M (0.45% yield—15 g of powder) presented a protein concentration of 19.5 mg/mL, hemagglutinating activity (HA) of 1024 and a specific hemagglutinating activity (SHA) of 52.51. On the other hand, the fraction (0–60%), obtained with ammonium sulfate with 60% saturation, presented a yield of 0.26 mg/100 mL, equivalent to 0.26%, and contained 2.5 mg/mL of protein, 2048 HA and 809.6 SHA, revealing that both preparations contained lectin. While in the electrophoresis

profile, BmoLL presented with two bands, one larger (33 KDa) and one smaller (27 KDa) in both preparations (Figure 1), confirming the presence of lectin in the samples.

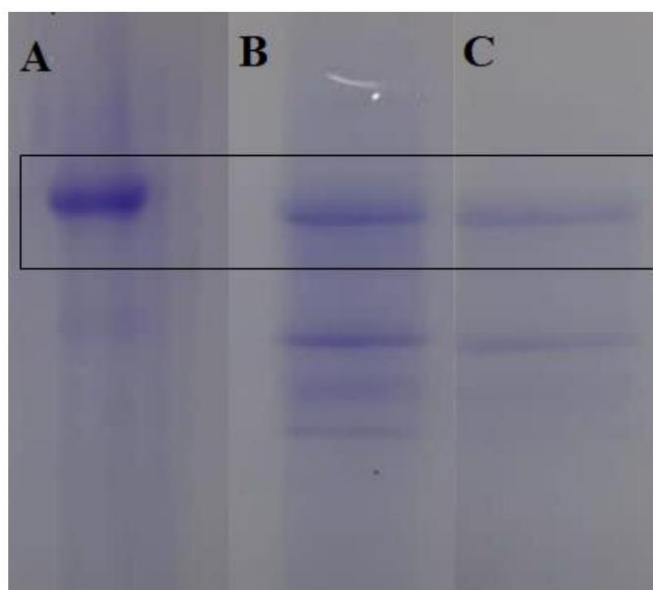


Figure 1. Electrophoresis profile. Application order: (A) Lectin BmoLL, (B) saline extract and (C) fraction.

In the TLC analysis, the presence of sugars with reddish-pink bands, saponins with light brown bands, flavonoids with a fluorescent yellow band and cinnamic derivatives with a bluish band were evidenced in the extract, while the fraction presented flavonoids and cinnamic derivatives (same bands but in lower intensity). The following classes of secondary metabolites were not evidenced in the extract and fraction: tannins, alkaloids, anthracenes and coumarins, and saponins were not evidenced in the fraction. Based on these results, the samples were analyzed by HPLC, monitored at 350 nm and the chromatographic profile represented in Figure 2A,B. Several peaks were observed in the HPLC profile with the use of a DAD detector, with five peaks being indicative of the presence of flavonoids (Figure 2C) [peak 1, retention time (rt) = 19.43 min; peak 2, rt = 24.25 min; peak 4, rt = 25 min; peak 5, equivalent to rutin, rt = 25.83 min; peak 7, rt = 29.40 min], one of hydroximic derivative (peak 3, rt = 24.74 min). Using the DAD detector, it was possible to verify that the UV-scan spectra of the compounds observed correspond to the presence of flavonoids in the sample [26], whose absorption maxima were: 255.5/355.7 nm (peak 1); 255.9/355.1 nm (peak 2); 258/354 nm (peak 4); 252/355 nm (peak 5) and 250/270/350 nm (peak 7). The compound evidenced in peak 3, with absorption maxima at 245.5/328.3 nm, corresponds to the presence of a hydroxycinnamic derivative, whose scanning spectrum was similar to the caffeic acid standard analyzed. The presence of rutin was confirmed by injecting the rutin standard, whose peak was observed in the same retention time for the rutin peak in the sample and with the same scanning spectrum. The rutin content for the saline extract and fraction was $0.53 \pm 0.0010\%$ and $0.24 \pm 0.0033\%$, respectively. Our results are similar to studies with BmoLL conjugated with quantum dots [20] which showed an HA of 1024 in hemagglutination tests, as well as in studies with extract of *Viola tricolor* [27] and ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* [28] regarding the presence of this metabolites.

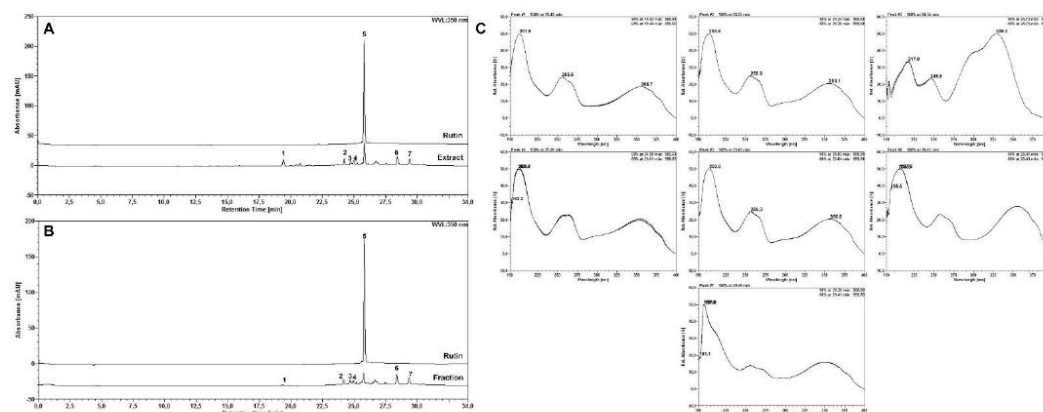


Figure 2. HPLC analysis of *Bauhinia monandra* samples. Chromatogram of the saline extract (A) and fraction (B); scan spectra (190–400 nm) corresponding to peaks 1 to 7 evidenced in both preparations (C). All analyses at 350 nm.

2.2. Effect of Preparations on *B. glabrata* Embryos

The evaluation of embryotoxic activity on embryos of *B. glabrata* snails is an essential aspect for assays of a molluscicide that attests efficiency in the control of *Schistosoma mansoni* [29]. From this perspective, the preparations presented embryotoxicity directly proportional to the concentrations used as observed in Table 1.

Table 1. Unviability of the different embryonic stages of *B. glabrata* exposed to saline extract and fraction of *B. monandra*.

Experimental Groups	Unviable by Test %				
	Embryonic Stages				
	Blastula	Gastrula	Trochophore	Veliger	Hippo Stage
H ₂ O	1.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	1 ± 1	1 ± 1	1.6 ± 0.6
NCL	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Saline Extract (mg/mL)	Blastula	Gastrula	Trochophore	Veliger	Hippo Stage
0.0125	25.3 ± 7.0 ^b	14.0 ± 3.4 ^a	0.6 ± 0.5	3.6 ± 1.5	1.6 ± 2.0
0.025	33.7 ± 2.0 ^c	37.0 ± 13.6 ^c	13.6 ± 6.4 ^c	11.0 ± 2.0	1.3 ± 0.5
0.05	61.0 ± 12.0 ^c	55.0 ± 5.3 ^c	29.6 ± 3.5 ^c	14.6 ± 4.6 ^b	5.3 ± 2.0
0.1	87.7 ± 1.5 ^c	71.3 ± 2.5 ^c	63.0 ± 4.0 ^c	23.6 ± 2.0 ^c	16.6 ± 2.0 ^a
0.2	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	77.3 ± 4.6 ^c	26.0 ± 5.2 ^c	33.0 ± 5.2 ^c
0.4	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	90.3 ± 1.1 ^c	59.3 ± 6.6 ^c	51.6 ± 17.6 ^c
0.6	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c
Fraction (mg/mL)	Blastula	Gastrula	Trochophore	Veliger	Hippo Stage
0.0125	13.3 ± 3.5	4.0 ± 1.0	5.6 ± 3.5	1.3 ± 0.6	2.0 ± 1.0
0.025	21.3 ± 2.5 ^c	33.0 ± 4.5 ^c	7.6 ± 2.3	11.3 ± 2.5	3.6 ± 2.5
0.05	37.6 ± 1.5 ^c	57.6 ± 4.1 ^c	24.3 ± 3.7 ^c	29.3 ± 7.2 ^c	24.3 ± 6.0 ^c
0.1	65.3 ± 9.0 ^c	88.6 ± 2.0 ^c	42.6 ± 3.8 ^c	51.3 ± 5.5 ^c	51.0 ± 9.1 ^c
0.2	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	64.0 ± 2.6 ^c	67.7 ± 4.2 ^c	57.3 ± 4.7 ^c
0.4	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	95.7 ± 2.5 ^c	92.7 ± 3.0 ^c	75.3 ± 4.5 ^c
0.6	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c	100 ± 0.0 ^c

Values were expressed as mean ± standard deviation. H₂O = negative control (dechlorinated filtered water); NCL = niclosamide—1.0 µg/mL and different concentrations of extract and fraction of *B. monandra* leaves (mg/mL). Each concentration was compared with the negative control: significance ^a = *p* < 0.05; ^b = *p* < 0.005; ^c = *p* < 0.0001.

The embryos exposed to dechlorinated filtered water (negative control) showed a low unviability rate (Figure 3A–E), while the niclosamide (positive control) showed 100% mortality (Figure 3F–J). The saline extract—at the lowest concentrations (0.0125 to 0.1 mg/mL)—showed unviability percentages of 25.3% to 87.7% and 14% to 71.3% for the stages of blastula and gastrula, respectively, while the fraction presented unviability of 13.3% to 65.3% and 4% to 88.6%, respectively, at the same concentrations. While in the trochophore, veliger and hippo stage, the extract presented—at concentrations of 0.1 to 0.4 mg/mL—non-viability ranging from 63.0%, 23.6% and 16.6% to 90.3%, 59.3% and 51.6%. However, when exposed to the fraction, the embryos in these stages presented greater sensitivity, especially in the concentration of 0.4, which revealed 95.7%, 92.7% and 75.3% unviability. In both preparations, when evaluated for the same stages, they showed 100% unviability when exposed to a concentration of 0.6 mg/mL. Studies when evaluating the embryotoxicity of *Euphorbia milii* latex [30] and aqueous extract of *Moringa oleifera* flower [31] observed toxicity to *B. glabrata* embryos; however, when compared to the preparations of *B. monandra*, they required higher concentrations or exposure time (0.2 mg/mL in 96 h and 0.5 mg/mL in 24 h, respectively) to produce a toxic effect (LC_{50} of 0.03 mg/mL and 2.37 mg/mL, respectively). Table 2 shows the values found for the lethal concentrations LC_{10} , LC_{50} and LC_{90} with both preparations.

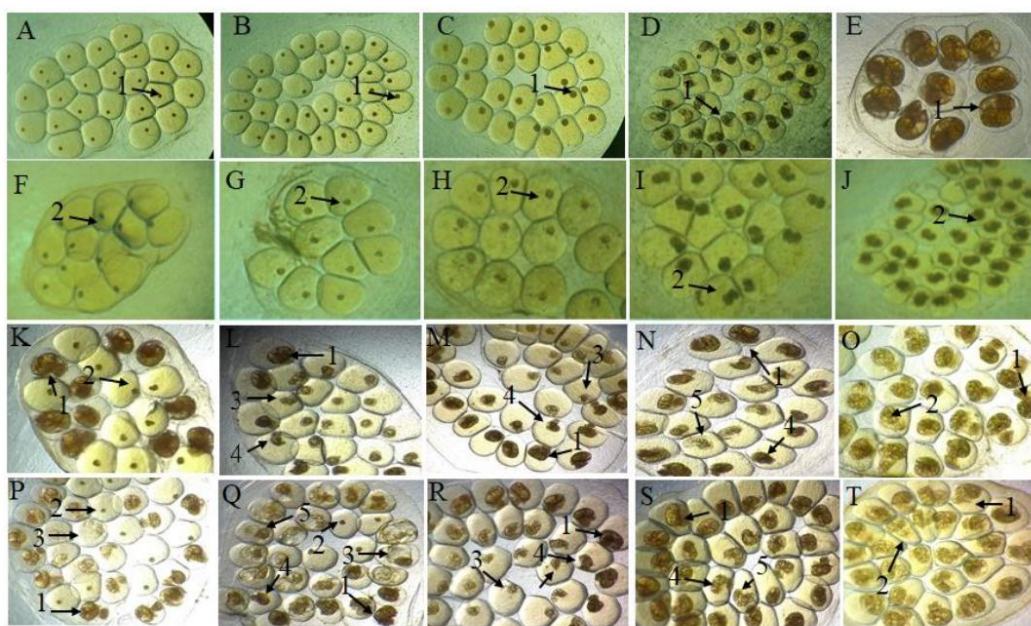


Figure 3. Embryonic stages of *B. glabrata* and exposure to saline extract and fraction for 24 h. Negative control in blastula stages (A); gastrula (B); trochophore (C); veliger (D) and hippo stage (E); embryos exposed to the positive control niclosamide, 1.0 µg/mL, (F–J); embryos exposed to saline extract at different concentrations (K–O); embryos exposed to the fraction at different concentrations (P–T). 1: Live embryo; 2: dead embryo; 3: hydropic embryo; 4: embryo with developmental delay; 5: malformation of the shell. All images with 40× magnification.

Although the mechanism of action has not yet been elucidated, our results demonstrate that *B. monandra* preparations have high toxicity and are capable of penetrating both the membrane and the gelatinous mass of the egg containing an embryo and causing unviability, as observed in Figure 3. The initial stages of blastula and gastrula showed a higher

susceptibility to our preparations, a result that was similar to that observed with usnic acid [32]. This effect is attributed in the initial stages to the strong cell proliferation observed in embryos in both stages, which make them more subject to teratogenic and lethal effects even in acute exposures [33,34]. Among the malformations observed, developmental delays stand out (Figure 3M), as well as hydropic embryos (Figure 3P) and shell malformations (Figure 3N). According to the study using saline extract and fraction enriched with lectin from *Parkia pendula* seeds [35], the different alterations presented after exposure may be associated with the capacity of protein/lectin to bind to different carbohydrates, causing damage, inhibition of hatching and death of these embryos. Embryos with teratogenic effects rarely hatch [36], thus, the presence of morphological alterations in embryos exposed to *B. monandra* preparations demonstrate the capacity to inhibit development and hatching, consequently causing population control of this host.

Table 2. Lethal concentrations of the different embryonic stages of *B. glabrata* after exposure to saline extract and fraction of *B. monandra*.

Lethal Concentrations (LC) (mg/mL)			
Saline Extract	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Blastula	0.0056 (0.0046–0.0067)	0.0420 (0.040–0.0434)	0.1552 (0.1538–0.1567)
Gastrula	0.0065 (0.0054–0.0077)	0.0417 (0.0405–0.0428)	0.1613 (0.1601–0.1624)
Trochophore	0.0166 (0.0150–0.0183)	0.0897 (0.0880–0.0913)	0.3981 (0.3964–0.3997)
Veliger	0.0312 (0.0219–0.0405)	0.3734 (0.3641–0.3827)	0.573 (0.5636–0.5823)
Hippo Stage	0.0476 (0.0371–0.0580)	0.3970 (0.3866–0.4075)	0.5925 (0.582–0.6029)
Adult snails (24 h)	3.73 (3.15–4.30)	6.6 (6.02–7.18)	9.47 (8.898–10.05)
Fraction	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Blastula	0.0073 (0.005–0.0096)	0.0478 (0.0455–0.0501)	0.1681 (0.1658–0.1703)
Gastrula	0.0071 (0.006–0.0082)	0.0419 (0.0408–0.0430)	0.1579 (0.1567–0.1590)
Trochophore	0.0227 (0.019–0.0263)	0.1582 (0.1544–0.1620)	0.3791 (0.3753–0.3829)
Veliger	0.016 (0.0126–0.0194)	0.0974 (0.094–0.1008)	0.3685 (0.3651–0.3719)
Hippo Stage	0.0178 (0.0143–0.0213)	0.0970 (0.0935–0.1005)	0.5489 (0.5454–0.5524)
Adult Snails (24 h)	0.37 (0.26–0.49)	0.87 (0.75–0.99)	1.70 (1.58–1.82)

()—95% confidence interval.

2.3. Effect of Preparations on Adult Snails of *B. glabrata*

The exposure of the preparations on adult snails of *B. glabrata* showed a dose-dependent effect, as observed in Figure 4. The saline extract showed a mortality percentage of 16.6% at a concentration of 4.0 mg/mL in 24 h (Figure 4A). However, the fraction was shown to be more active in the concentrations analyzed, with mortality percentages of 83.3% at a concentration of 1.0 mg/mL and 100% at a concentration of 2.0 mg/mL (Figure 4B). When evaluated for 7 days after exposure, the saline extract (48 h) presented increasing mortality (Figure 4C) with percentages of 63% to 100% (0.5–4.0 mg/mL) while the fraction (24 h) was constant (Figure 4D). All *B. glabrata* snails that died during exposure demonstrated intense retraction, mucus production and hemolymph release. Similar alterations, such as tissue damage and loss of biological functions to *B. glabrata* snails, were observed with exposure to the saline extract and fraction of *P. pendula* [35].

The population control of the intermediate host is of paramount importance, because the interruption of the life cycle of the parasite prevents the emergence of new cases of the disease [37]. Thus, the search for plant preparations that present molluscicide activity has increased in recent decades [38–40]. Samples containing secondary metabolites (saponins, tannins, steroids and flavonoids) were suggested as the main agents [41,42], thus, secondary metabolites present in the leaves of *B. monandra* indicate constituents capable of presenting molluscicidal action. The molluscicidal activity of chlorophyll extracts were analyzed for *Biomphalaria alexandrina* snails and *Leptodactylus natalensis* and a dose-responsive reduction in survival rates for these vectors was observed [43]. In another trial for the population control of snails (*Pomacea canaliculata*), this reduction was also observed using preparations of *Nerium indicum* leaves, but at a longer exposure time (96 h) [44].

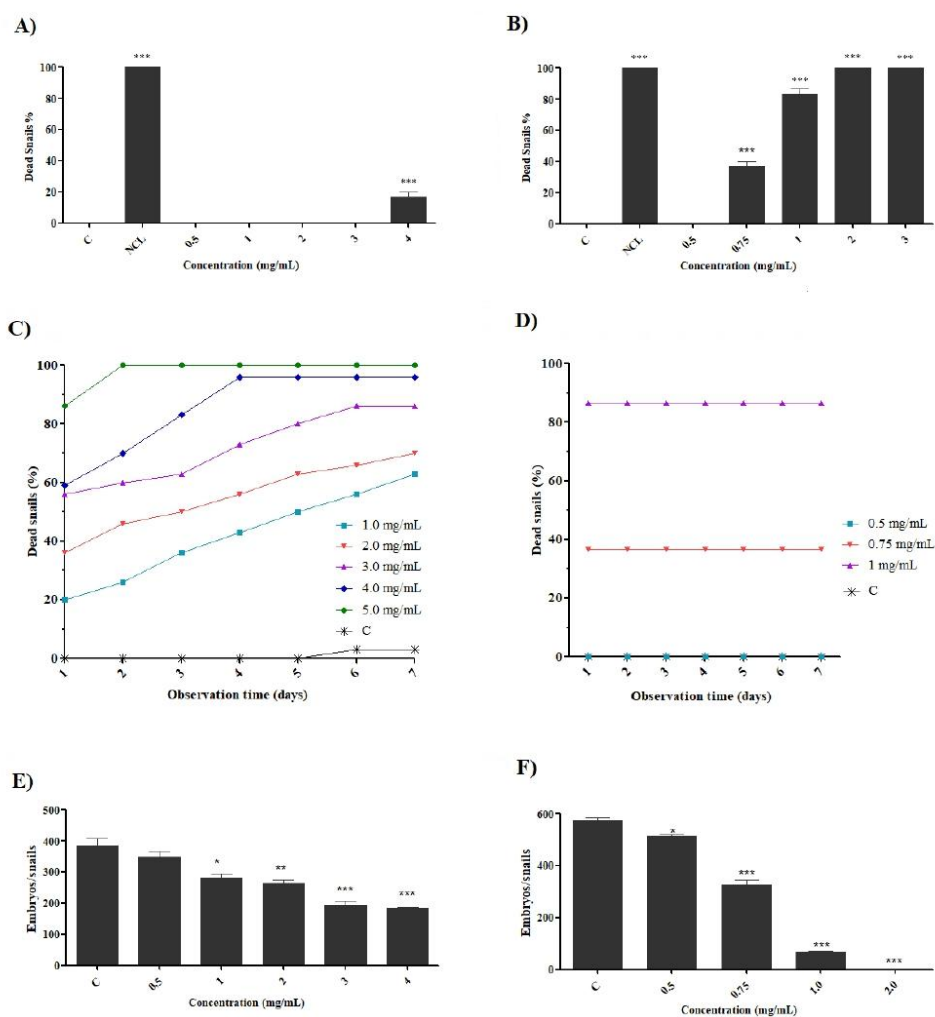


Figure 4. Molluscicidal activity against adult *B. glabrata* snails. Snails exposed to saline extract (A) and fraction for 24 h (B); snails exposed to saline extract (C) and fraction after 7 days of observation (D); fecundity of snails exposed to saline extract (E) and fraction after 7 days of observation (F). C = negative control; NCL = niclosamide: 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Each concentration was compared with the negative control: significance * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ and *** = $p < 0.001$.

The reduction in fertility and fecundity of snails due to exposure to molluscicide agents can help in population study [37,45]. The preparations tested in the present study induced a decrease in egg oviposition, both in the case of the saline extract (reduction from 10.55% to 52.65% at 0.5 and 4.0 mg/mL, respectively) (Figure 4E) and the fraction (reduction from 9.62% to 88.52% at 0.5–1.0 mg/mL, respectively) (Figure 4F). Effects such as reduced egg hatching and decreased fecundity rates were also seen when evaluating the toxic capacity of *Ramalina aspera* [16], potassium usnate [36] and curcumin [46] on *B. glabrata*. Studies have suggested that the reduction in egg deposition of snails when ex-

posed to *Haplophyllum tuberculatum* [47] and organotin [48] is associated with the decreased biosynthesis of hormones such as progesterone and testosterone, which they associated with decreased fertility.

2.4. Effect of Preparations on *B. glabrata* Hemocytes

As observed in Figure 5, *B. monandra* preparations showed morphological alterations in hemocytes, such as binuclear cells (BN), micronucleus (MN) and cells with morphological characteristics of apoptosis (PA) with reduced cytoplasm and nuclear fragmentation. These typical features of apoptosis are also described when the toxicity of cadmium telluride (CdTe) quantum dots suspensions against *B. glabrata* was evaluated [49].

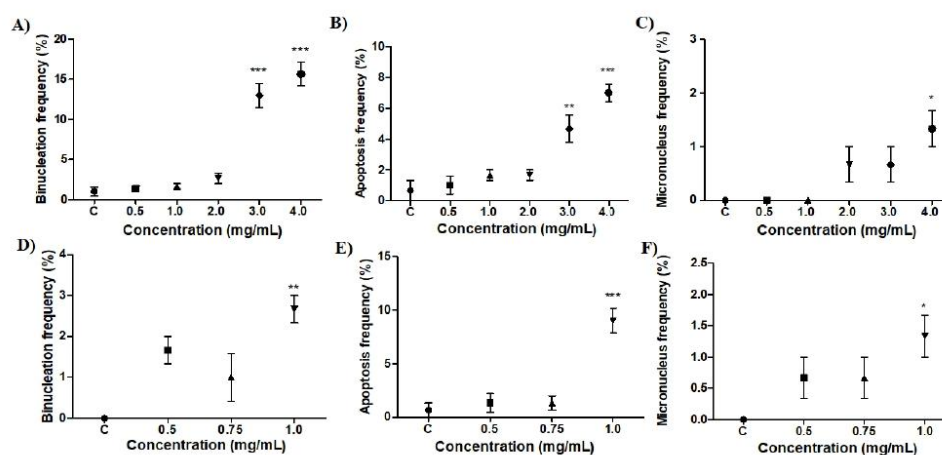


Figure 5. Morphological changes after exposure to different concentrations of saline extract and fraction. Binuclear cells (A), apoptosis (B) and micronucleus alterations after exposure to saline extract (C); binuclear cells (D), apoptosis (E) and micronucleus alterations after exposure to the fraction (F). C: negative control. Dot shapes are only to differentiate concentrations. Each concentration was compared with the negative control: significance * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ and *** = $p < 0.001$.

The negative control presented hyalinocytes and granulocytes, as well as a few morphological alterations, such as BN and AP. The saline extract had a significant effect for BN (Figure 5A) and AP (Figure 5B) at the highest concentrations (3.0 and 4.0 mg/mL) and MN (Figure 5C) only at 4.0 mg/mL when compared to the negative control group, with $\pm$ mean standard deviation of 13 ± 2.6 and 15.6 ± 2.5 (BN); 4.6 ± 1.5 and 7 ± 1 (AP) and 1.3 ± 0.5 (MN), respectively. However, for the fraction, the cellular alterations observed were AP (Figure 5E), BN (Figure 5D) and MN (Figure 5F) only at 1.0 mg/mL with significant differences with mean $\pm$ standard deviation of 9 ± 2 , 2.6 ± 0.5 and 1.3 ± 0.5 , respectively, in relation to the negative control group.

Hemocytes are indispensable in the immunological response of snails and their increase may be related to several factors, such as environmental changes and exposure to pathogens and/or pollutants, making it possible to perceive and quantify changes observed in them [50–53]. Apoptosis is a self-induced mechanism of death and an important physiological process for homeostasis and immune response [54]. Similar results are presented with potassium usnate [36] and extract and fraction of *P. pendula* [35], demonstrating the importance of the study with AP and BN cells to evaluate the toxic effects on *B. glabrata* hemocytes. Thus, the preparations showed significant cytotoxic effects in the highest concentrations evaluated. However, it is possible to observe these cellular alterations in most concentrations used, which demonstrates the toxic character of *B. monandra* preparations.

2.5. Comet Test

Figure 6A shows the DNA alterations that were quantified and classified into the five categories of damage.

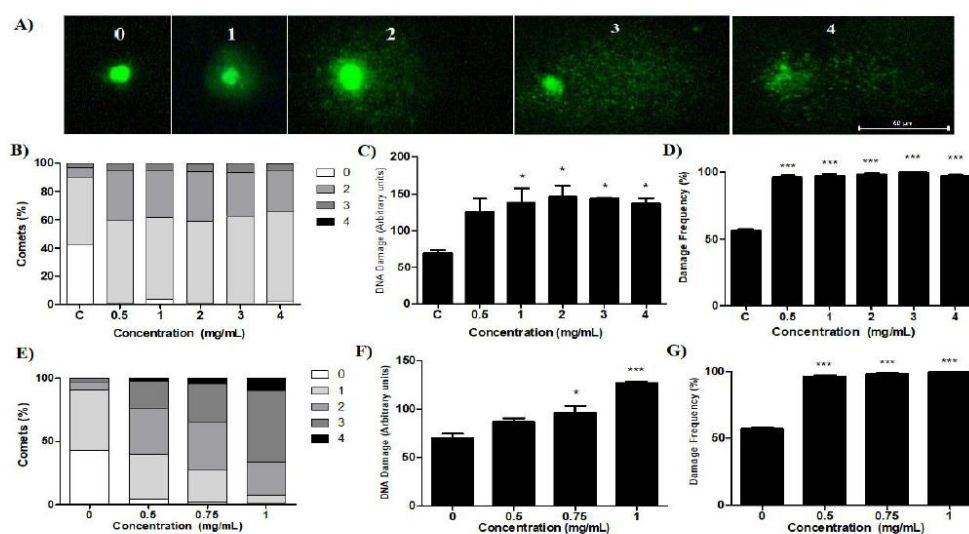


Figure 6. Comet assay images obtained from *B. glabrata* hemocytes stained with Sybrsafe™, and DNA damage after exposure to different concentrations of saline extract and fraction. Different degrees of damage, where 0 indicates absence and 1 to 4 indicates increasing DNA damage (A), damage levels (B), index (C) and frequency of damage after exposure to saline extract (D); damage levels (E), index (F) and damage frequency after exposure to fraction (G). C: negative control. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

Snails exposed to the saline extract showed different levels of damage category (Figure 6B) according to concentrations of 0.5 to 4.0 mg/mL, with levels 1 (58.3–63.3%) and 2 (35–29%), respectively. As for the index (Figure 6C) and frequency of damage (Figure 6D), significant differences were observed in all concentrations with index values 135 to 146 and percentages from 96% to 100%, respectively, for the concentrations used. The fraction showed an increase in DNA changes (Figure 6E) at the highest concentration (1.0 mg/mL), levels 2 (26%), 3 (56%) and 4 (10.33%). The index (Figure 6F) and the frequency of damage (Figure 6G) showed significance at concentrations of 0.75 and 1.0 mg/mL, with values of 95.81% and 98%, and 127.0 and 99.3%, respectively. Studies highlight the sensitivity that the comet assay must assess DNA damage through the electrophoretic migration of nucleotides present in lysed cells in a thin layer of agarose [55,56]. Although the mechanisms through which our preparations interact with the cell producing DNA damage are not elucidated, we can state that both preparations produce genotoxic damage in *B. glabrata* hemocytes. However, studies suggest that oxygen reactive species, produced due to the oxidation of the protoporphyrinogen oxidase enzyme, may induce genotoxicity, damaging the DNA chain and modifying its nitrogen bases [57,58]. Furthermore, other studies also suggest that damage to DNA and other macromolecules may result from superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals that result from cellular metabolism [59]. Thus, we can suggest that the various rates of DNA damage seen with our preparations may be corroborating oxidative stress, which in an uncontrolled way results in a breakdown of the DNA tape [35,60]. Studies also reported an increase in DNA damage rates in groups treated with

household slat [61], sodium selenium [62] and aqueous extract of *Anagallis arvensis* [63], which corroborates our results.

2.6. Evaluation of Toxicity in *S. mansoni* Cercariae

The parameters of motility and mortality of the cercariae exposed to the preparations are observed in Table 3.

Table 3. Scores of cercariae exposed to saline extract and fraction of *B. monandra* in relation to exposure time.

Experimental Group (mg/mL)	Exposure Time (Minutes)				
	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Controls					
Negative Control H ₂ O	3	3	3	3	3
Niclosamide 0.001	0	0	0	0	0
<i>B. monandra</i>					
Saline extract					
4.0	3	2	1	1	1
3.0	3	2	1	1	1
2.0	3	3	3	3	3
1.0	3	3	3	3	3
0.5	3	3	3	3	3
<i>B. monandra</i>					
Fraction					
2.0	3	2	1	0	0
1.0	3	2	2	1	1
0.75	3	3	3	2	1
0.5	3	3	3	3	3

Motility score: 3: intermittent *tail-first* natatory movements. 2: Reduction in movement with slow pace. 1: Contortions and movement at only one end. 0: Complete absence of movement/death.

Figure 7 presents the different exposures: (A) to the negative control presenting maintenance of the cercariae structure, (B) to niclosamide with total death of the cercariae and (C) to the fraction, with separation of tail and cercarial body.

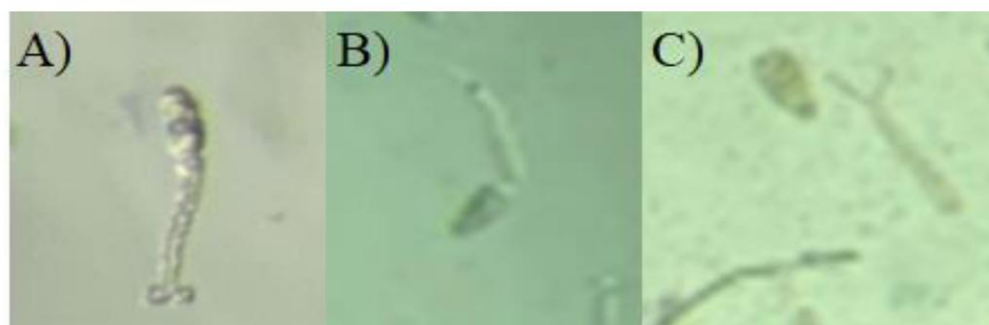


Figure 7. Cercariae of *S. mansoni* exposed to the fraction. Exposed to the negative control (A); to niclosamide: 1.0 µg/mL (B) and to the fraction with tail and cercarial body separation (C).

After 60 min of exposure to the saline extract, it is possible to observe reduction in movement at 3.0 mg/mL with a motility score of 1 (presenting contortions and movement in only one extremity). The fraction, in addition to a reduction in motility (1.0 mg/mL), presented total mortality of the cercariae, at a concentration of 2.0 mg/mL for 90 min,

demonstrating to be more toxic. Studies reveal that this effect on the motility of the cercariae occurs because the catalytic activity of the neurotransmitter acetylcholinesterase is reduced, due to damage to the parasympathetic nervous system level of the cercariae [64,65], and observed changes in the motility of *S. mansoni* cercariae when exposed 120 min to the aqueous extract of *Glinus lotoides* [39] that resulted in low infectivity, and, consequently, a reduction in parasitic load. When the cercariae's mortality was evaluated in exposure to essential oil (EO) of *Croton rudolphianus* leaf [40] and divaricatic acid [12], respectively, a reduction in dose-dependent motility related to exposure time could also be observed. In addition to these evaluations, the reduction in motility and mortality came through exposure rough ether extract of *Ramalima aspera* [16] and potassium usnate [65].

2.7. *Artemia Salina* Acute Test

The potential ecotoxicity of the preparations was assessed with the crustacean *A. salina* (Figure 8).

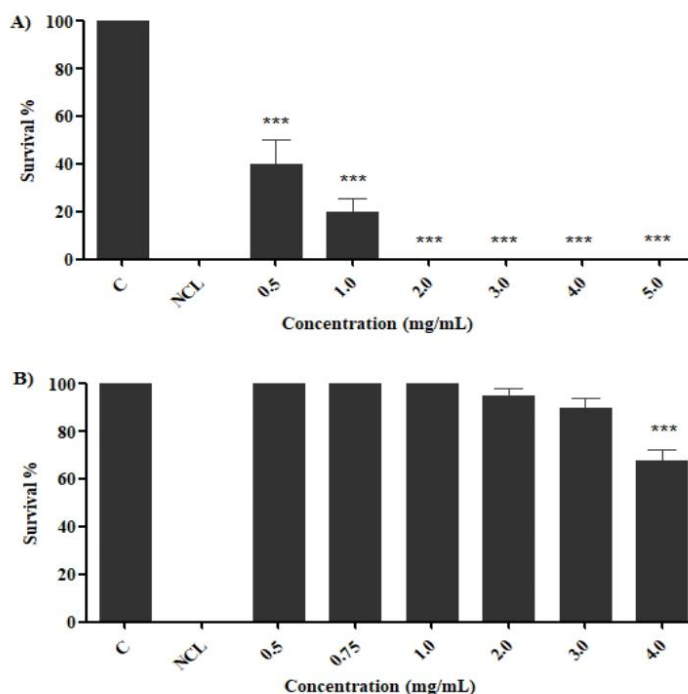


Figure 8. Survival of *A. salina* to *B. monandra* preparations after 24 h exposure. Exposed to saline extract (A) and fraction (B). C: negative control; NCL: niclosamide: 1.0 μ g/mL. Each concentration was compared with negative control: significance *** = $p < 0.001$.

The extract revealed toxicity in the concentrations used (0.5–5.0 mg/mL) with survival percentages of 50–0% (Figure 8A), while the fraction, at concentrations of 0.5 mg/mL to 3.0 mg/mL, revealed 100% to 90% survival (Figure 8B). Thus, when compared to niclosamide (1 μ g/mL), the preparations revealed higher survival of *A. salina* nauplii, especially to the fraction, even when evaluated under molluscicide concentrations. This evaluation is necessary, because the use of molluscicides usually results in environmental toxicity, affecting species that inhabit the target locality, thus making the use punctual and restricted, as well as the affected aquatic species being constantly monitored [66].

3. Materials and Methods

3.1. Plant

Leaves of *B. monandra* were collected at the Academic Center of Vitória (CAV) in Alto José Leal, Vitória de Santo Antão (8°06'59.5" S 35°17'55.1" W), Pernambuco, Brazil.

3.2. Animals

Juveniles of adult snails of *B. glabrata* were collected in the municipality of São Lourenço da Mata (Pernambuco, Brazil) and kept in the aquaria of the Radiobiology Laboratory of the Department of Biophysics and Radiobiology of UFPE and used as experimental animals. The snails were kept in aquariums with chlorinated filtered water (temperature: 25 ± 3 °C, pH 7.0) with light/dark cycle (12 h) and fed ad libitum daily with lettuce leaves (*Lactuca sativa*).

3.3. Preparation of Saline Extract and Fraction of *B. monandra*

To obtain the saline extract, the collected leaves were washed in running water followed by distilled water and allowed to dry at room temperature for 2 days. The dried leaves were sprayed in a multiprocessor of extracts (10%, w/v) and the powder (15 g) was added to 150 mL of citrate-phosphate buffer 10 mM, pH 6.5, containing NaCl 0.15 M. The mixture was maintained overnight at 4 °C under gentle agitation using a magnetic stirrer. For the fraction, after the execution of the previous step, the material was passed through gauze and centrifuged for 15 min at 12,000 g at 4 °C. Ammonium sulfate with 60% saturation was added to the supernatant to precipitate proteins; the material was kept under gentle agitation at 28 °C for 4 h, then centrifuged (12,000 g, 4 °C, 15 min) and lyophilized.

3.4. Protein Concentration and Hemagglutinating Activity

The protein concentration in the preparations was determined using bovine serum albumin as standard (0.05–0.5 µg/mL) [67]. Hemagglutinating activity (HA) was used to determine the presence of lectin [68]. The hemagglutination unit was defined as a value related to the highest dilution of the sample that agglutinated the erythrocytes and the specific HA (SHA), the HA value divided by the protein concentration value.

3.5. Phytochemical Screening

The saline extract and the fraction were analyzed for the presence of secondary metabolites according to standard procedures, using different reagents as shown in Table 4.

Table 4. Chromatographic conditions for identification of chemical profile by thin layer chromatography (TLC).

Metabolite Class	System	Reference Compounds	Developer
Cinnamic derivatives	(90:5:5)	Caffeic acid	AlCl ₃
Flavonoids	(90:5:5)	Quercetin	AlCl ₃
Hydrolysable tannins	(90:5:5)	Gallic acid	FeCl ₃
Condensed Tannins	(90:5:5)	Catechin	Vanillin Hydrochloric + Δ
Coumarin	(50:50:50)	Coumarin	KOH
Terpenes/Steroids	(90:10)	β-sitosterol	Liebermann-Burchard + Δ
Saponins	(16:10:2.5)	Escin	Liebermann-Burchard + Δ
Anthracenes	(20:30:15:0.5)	Sennoside B	HNO ₃ + Δ + KOH
Sugars	(100:11:11:26)	Glucose	Thymol + H ₂ SO ₄ + Δ
Alkaloids	(70:20:10)	Piperine	Dragendorff

AlCl₃: 5% aluminum chloride in methanol; FeCl₃: railway; Δ: enthalpy/heating; KOH: potassium hydroxide; HNO₃: nitric acid; H₂SO₄: sulfuric acid. 90:5:5 = ethyl acetate, formic acid and water; 50:50:50 = toluene, ethyl ether and glacial acetic acid (saturation); 90:10 = toluene, ethyl acetate; 100:11:11:26 = ethyl acetate, glacial acetic acid, formic acid and water; 16:10:2.5 = chloroform, methanol and water; 20:30:15:0.5 = ethyl acetate, n-butyl alcohol, water and glacial acetic acid; 70:20:10 = toluene, ethyl acetate, diethylamine.

Samples and reference compounds were manually applied to chromatographic plates of silica gel 60 F254 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG[®] (Düren, Germany)). The plates were developed in vats after saturation with the mobile phase. The tank was saturated for 15 min at room temperature and the bands were applied. The samples were applied to 0.5 cm from the origin and with 0.5 cm ending from the end of the plate. After plate elution, they were dried at room temperature and observed under ultraviolet light of 254 and 365 nm and visible light. Next, they were revealed with specific reagents for each metabolite and the bands obtained were compared to the corresponding pattern. The order of application and visualization followed pattern, extract and fraction, while for the detection of lectin, the electrophoresis profile in polyacrylamide gel under denaturing conditions was observed [69]. The standard protein levels used on this research were phosphorylase b (97 KDa), bovine serum albumin (66 KDa), ovalbumin (45 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), trypsin inhibitor (20.1 KDa) and α -lactalbumin (14.4 KDa), acquired by GE Healthcare (Chicago, IL, USA). The gels were colored with bright Coomassie blue G 250, with the following order of application: fraction, extract and lectin BmoLL.

3.6. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis

HPLC analysis was developed in a HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) system, coupled to a photodiode arrangement detector (DAD; Thermo Fisher Scientific) and equipped with binary pump (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degassing and automatic sampler equipped with a 20 μ L loop (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). The wavelengths of analysis were 270 and 350 nm. Chromatographic dissections were obtained with a C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm d.i., 5 μ m) Supelco[®] equipped with pre-column (C₁₈ of 4 mm $\times$ 3.9 mm; Phenomenex[®]). The two-way sections were performed at a temperature of 26 ± 1 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water (A) and methanol (B), both acidified with trifluoroacetic acid at 0.05% and flow of 0.8 mL/min. A gradient program was applied as follows: 0–10 min, 5–20% B; 10–14 min, 20–25% B; 14–18 min, 25–40% B; 18–25 min, 40–80% B; 25–30 min, 80% B; 30–34 min, 80–5% B; 34–36 min, 5% B. Data were analyzed after triplicate injection and processed using Chromeleon software (Dionex/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Additionally, the content of rutin was calculated based on the equation of the calibration curve obtained for the rutin standard (>94%, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). The calibration curve was obtained with 5 points, in the concentration range of 2.00–3.00 μ g/mL, and evaluated in triplicate of each concentration. The R² value was greater than 0.99 (=0.9953). The curve obtained is included in the supplementary material.

3.7. Toxicity of Preparations in Embryonic Stages of *B. glabrata*

The embryos were collected from aquariums containing *B. glabrata* snails and separated (n = 100) in the stages of blastula (0 to 15 h), gastrula (24 to 39 h), trochophore (48 to 87 h), veliger (96 to 111 h) and hippo stage (144 to 168 h) and exposed in Petri dishes for 24 h preparations at different concentrations (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 mg/mL). For the negative and positive control, dechlorinated filtered water and niclosamide (1 μ g/mL) were used, respectively. After exposure, the embryos were washed (dechlorinated filtered water), transferred and kept in plates containing chlorinated filtered water, monitored for 7 days, and classified as viable (normal) and unviable (malformations and dead) [65]. Two independent experiments were carried out in triplicate.

3.8. Toxicity, Fertility and Fecundity Analysis in Adult Snails of *B. glabrata*

Adult snails (n = 10) with 10–14 mm shell diameter were exposed to *B. monandra* preparations for 24 h, at different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/mL), with a final volume of 60 mL. After exposure, the snails were washed (filtered and dechlorinated water) and observed for 7 days, and the mortality rate recorded daily. The snails were considered dead when they presented no movement, release of hemolymph, retraction and/or discoloration of the shell. The negative and positive control groups were performed

under the same conditions although chlorinated filtered water and niclosamide (1 µg/mL) were used, respectively [70]. Two independent experiments were carried out in triplicate.

The effect on fertility and fecundity was performed by the analysis of embryos deposited by the surviving snails after exposure of the preparations at different concentrations (0.5–4.0 mg/mL). The egg position of the embryos was recorded for seven consecutive days, started after 24 h of exposure, being analyzed until complete hatching in the negative control group (dechlorinated filtered water). Then, after hatching, the embryos were counted and classified as viable (normal) and unfeasible (malformed and dead) [36].

3.9. Evaluation of Cytotoxicity in *B. glabrata* Snail Hemocytes

Adult snails ($n = 10$) were exposed to the sublethal concentrations of saline extract (0.5–4.0 mg/mL) and fraction (0.5–1.0 mg/mL) for 24 h. After exposure, the snails were placed in containers with chlorinated filtered water for another 24 h. Negative control was used under the same conditions only with dechlorinated filtered water. Surviving mollusks (three per concentration) were randomly selected for hemolymph collection and morphological analysis [55,71]. Hemolymph (100 µL) was collected and deposited in microscopic slides and then ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in Ringer's solution (10 mM) was added and stored in a wet chamber (40 min). The cells were fixed with glutaraldehyde (200 µL; 10 min) in Ringer's solution at 1% (v/v) and then washed with Ringer's solution and flushed with Giemsa at 5% (5 min). Hemocytes ($n = 1000$ cells/group) were analyzed under an optical microscope (Leica DM1000, Avantor®, Radnor Township, PE, USA), with a 100× objective in triplicate.

3.10. Evaluation of Genotoxicity by Comet Assay

Hemolymph (100 µL) collected from *B. glabrata* exposed to sublethal concentrations of saline extract (0.5–431.4 mg/mL), fraction (0.5–1.0 mg/mL) or dechlorinated filtered water were homogenized in low melting point agarose (1:1). Immediately, this homogenate was placed on microscope slides, previously covered with a normal melting point agarose layer (1.5%) dissolved in PBS (pH 7.4), kept with coverslip and maintained at 4 °C (10 min). After solidification, the coverslips were removed and the slides incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton-X 100 and 10% DMSO, pH 10.0) for 12 h (4 °C). After lysis, the slides were placed in a horizontal electrophoresis vat containing a buffer and alkaline solution, pH 13.0 (1 mM EDTA and 300 mM NaOH), for 20 min. Subsequently, electrophoresis was started for 20 min (4 °C) at 0.74 V/cm and 300 mA. At the end, the slides were neutralized with Tris-HCl 0.4 M buffer (pH 7.5; 15 min) fixed in absolute alcohol (10 min), dried at room temperature, stored at 4 °C and subsequently analyzed [72].

3.11. Fluorescence Microscopy Analysis

The slides were analyzed using a fluorescence microscope (Nikon H550L, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan) with magnification of 400×, excitation filter: 450–490 nm, emission filter: 500–550 nm and barrier filter: 495 nm. To bluish the slides, a SYBR (Invitrogen) solution (50 µL; 1:500) was used and damage to the DNA of the hemocytes was visually evaluated [73]. One hundred nuclei were counted for each replica, totaling 400 nuclei, then classified into 5 categories of DNA damage (0, 1, 2, 3 and 4), depending on the extent of the damage. Category 0 indicates that no damage has occurred, while categories 1 to 4 indicate increasing levels of damage to the genetic material. To assess the degree of DNA damage, the damage index (ID) and the frequency of damage (FD%) were used as parameters. The ID was calculated according to the formula: $ID = 0$ (number of comets category 0) + 1 (number of comets category 1) + 2 (number of comets category 2) + 3 (number of comets category 3) + 4 (number of comets category 4). The FD% was calculated as the percentage value of all comets with DNA damage (category 1–4) in relation to the total number of comets (categories 0–4).

3.12. Activity in *S. mansoni* Cercariae

Adult snails of *B. glabrata* infected with *S. mansoni* (strain, Belo Horizonte, Brazil) were placed in Becker (60 mL), submerged in filtered and dechlorinated water (100 mL) and exposed to artificial light (60 W; 2 h) to eliminate cercariae. A suspension of approximately 100 cercariae were kept in watch glass and exposed to preparations at different concentrations (0.5–5.0 mg/mL). As negative and positive controls, dechlorinated filtered water and niclosamide (1.0 µg/mL) were used, respectively. The test was performed in triplicate and the lethality of the cercariae was observed at intervals of 15, 30, 60 and 120 min after exposure to preparations with the aid of a stereomicroscope (Model 5289, Lumen, Monroe, LO, USA) [16]. During the intervals, the cercariae were evaluated regarding the motility scores: intermittent tail-first natatory movements (3), reduction in slow-paced movement or on the axis itself (2), lethargy and/or contortions and movement in only one end (1) and complete absence of movement of the cercariae (0).

3.13. Environmental Ecotoxicity Assessment Using *A. salina*

Encysted eggs of *A. salina* (Brine Shrimp Co., Mackay Marine®, Great Salt Lake, UT, USA) were placed in a beaker with 500 mL of seawater and constant arenization at room temperature (25 ± 3 °C) for 48 h. After hatching, larvae at Instar II–III stages were collected and divided into experimental groups ($n = 10$) with the help of a stereomicroscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland) as follows: negative controls (seawater), positive control (1.0 µg/mL-niclosamide) and preparations at different concentrations (0.5–5.0 mg/mL) for 24 h to 25 ± 3 °C [74]. Two experiments were carried out in quadruplicate and the evaluation of mortality and survival performed with the help of a stereomicroscope.

3.14. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA). The analysis of variance (ANOVA) was employed, and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Tukey's test was used to identify the difference between groups. The lethal concentrations (LC) required to kill 10%, 50% and 90% of *B. glabrata* (embryos and adult snails) were calculated by Probit analysis with a confidence interval of 95% using the StatPlus® 2009 software (Soft Analyst, Vancouver, BC, Canada).

4. Conclusions

The saline extract and fraction of *B. monandra* are promising candidates for the control of *S. mansoni* infection, since both have had molluscicidal effects against *B. glabrata* and are cercaricidal, along with having low environmental toxicity compared to that of the commercial molluscicide niclosamide. The use of *B. monandra* as a new molluscicide depends on future research to prove its action and environmental safety in large-scale field conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27154993/s1>, Figure S1. Calibration curve obtained for standard rutin.

Author Contributions: T.W.d.A.A., H.D.A.d.A., A.d.L.A.: developed the studied protocols. T.W.d.A.A., J.J.B., S.A.d.O.F., M.d.V.L.S., D.R.P., M.R.A.F., L.A.L.S., A.M.M.d.A.M., M.C.P.d.A.A., A.d.L.A., H.D.A.d.A., L.C.B.B.C.: performed the assays and were involved in the analysis and interpretation of all data. T.W.d.A.A., J.J.B., A.d.L.A., H.D.A.d.A., L.C.B.B.C.: contributed to the writing of the manuscript and/or critical review and intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grantand L.C.B.B. Coelho Fellowship (309923/2019-0); also, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES n 001) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). T.W.A. Aguiar and H.A.D. Araújo would like to thank FACEPE for the Graduate Scholarship (PBPG-0471-2.08/21) and Researcher Fixation Scholarship (BFP-0080-2.08/20), respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could influence the work reported in this article.

Sample Availability: Samples of the compounds of *Bauhinia monandra* preparations are available from the authors.

References

1. Faria, R.X.; Rocha, L.M.; Souza, E.P.B.S.S.; Almeida, F.B.; Fernandes, C.P.; Santos, J.A.A. Molluscicidal activity of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Acta Trop.* **2018**, *178*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
2. Lima, A.S.; Fernandes, Y.M.L.; Silva, C.R.; Costa-Junior, L.M.; Figueiredo, P.L.B.; Monteiro, O.S.; Maia, J.G.S.; da Rocha, C.Q. Anthelmintic evaluation and essential oils composition of *Hyptis dilatata* Benth. and *Mesosphaerum suaveolens* Kuntze from the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* **2022**, *228*, 106321. [CrossRef] [PubMed]
3. WHO. *The Promotion and Development of Traditional Medicine: Report of a WHO Meeting, Geneva, Switzerland, 28 November to 2 December 1977*; Technical Report Series 622; WHO: Geneva, Switzerland, 1978; p. 41.
4. Ribeiro, E.C.G.; Leite, J.A.C.; Luz, T.R.S.A.; Silveira, D.P.B.; Bezerra, S.A.; Frazão, G.C.C.G.; Pereira, L.P.L.A.; Guimarães dos Santos, E.G.; Ribeiro Filho, P.R.C.F.; Soares, A.M.S.; et al. Molluscicidal activity of monoterpenes and their effects on inhibition of acetylcholinesterase activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* **2021**, *223*, 106089. [CrossRef]
5. Schalla, V.T.; Vasconcellos, M.C.; Rocha, R.S.; Souza, C.P.; Mendes, N.M. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant Molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): A longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Trop.* **2001**, *79*, 165–170. [CrossRef]
6. Pereira, L.P.L.A.; Ribeiro, E.C.G.; Brito, M.C.A.; Araruna, F.O.S.; Araruna, F.B.; Leite, J.A.C.; Silveira, D.P.B.; Oliveira, T.M.; Cantanhede, S.P.D.; Firmo, W.D.C.A.; et al. Molluscicidal and cercaricidal activities of the essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants: Implications for the control of schistosomiasis. *Acta Trop.* **2022**, *230*, 106393. [CrossRef]
7. World Health Organization. Schistosomiasis. W.H.O. 2022. Available online: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> (accessed on 8 May 2022).
8. Scholte, R.G.; Gosoniu, L.; Malone, J.B.; Chammartin, F.; Utzinger, J.; Vounatsou, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop.* **2014**, *132*, 57–63. [CrossRef]
9. Paz, W.S.D.; Gomes, D.S.; Ramos, R.E.S.; Cirilo, T.M.; Santos, I.G.A.; Ribeiro, C.J.N.; Araújo, K.C.G.M.; Jesus, A.M.R.; Santos, A.D.D.; Bezerra-Santos, M. Spatiotemporal clusters of schistosomiasis mortality and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil (1980–2017). *Acta Trop.* **2020**, *212*, 105668. [CrossRef]
10. Coelho, P.M.Z.; Caldeira, R.L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect. Dis. Poverty.* **2016**, *5*, 57. [CrossRef]
11. Paz, W.S.; Duthie, M.S.; Jesus, A.R.; Machado de Araújo, K.C.G.; Santos, A.D.; Bezerra-Santos, M. Population-based, spatiotemporal modeling of social risk factors and mortality from schistosomiasis in Brazil between 1999 and 2018. *Acta Trop.* **2021**, *218*, 105897. [CrossRef]
12. Silva, H.A.M.F.; Siqueira, W.N.; Sá, J.L.F.; Silva, L.R.S.; Martins, M.C.B.; Aires, A.L.; Amâncio, F.F.; Pereira, E.C.; Albuquerque, M.C.P.A.; Melo, A.M.M.A.; et al. Laboratory assessment of divaric acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta Trop.* **2018**, *178*, 97–102. [CrossRef] [PubMed]
13. World Health Organization. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: An operational manual for programme managers. W.H.O. **2017**, *40*. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254641> (accessed on 18 April 2022).
14. Albuquerque, L.P.; Pontual, E.V.; Santana, G.M.S.; Silva, L.R.S.; Aguiar, J.S.; Coelho, L.C.B.B.; Régio, M.J.B.M.; Pitta, M.G.R.; Silva, T.G.; Melo, A.M.M.A.; et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* **2014**, *138*, 23–27. [CrossRef] [PubMed]
15. Araújo, C.S.F.; Araujo, T.F.S.; Silva, C.B.; Campos, J.K.L.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H.; Albuquerque, P.B.S.; Lima, V.L.M.; Coelho, L.C.B.B. Evaluation of toxicity on mice and artemicidal activity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). *Theory Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *1*, 44–52. [CrossRef]
16. Silva, H.A.M.F.; Sá, J.L.F.; Siqueira, W.N.; Lima, M.V.; Martins, M.C.B.; Aires, A.L.; Albuquerque, M.C.P.A.; Falcão, E.P.D.S.; Buril, M.L.L.; Pereira, E.C.; et al. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta Trop.* **2019**, *196*, 172–179. [CrossRef]
17. Nworie, K.M.; Okorie, N.A. Phytochemicals distribution and antioxidant potential of *Bauhinia monandra* (Linn.) leaves extract. *Res. J. Med. Plants.* **2018**, *12*, 78–83. [CrossRef]

18. Kurz, W.S. Natural History. *J. Asiat. Soc. Bengal*. **1873**, *42*, 1–73.
19. Cagliari, R.; Kremer, F.S.; Pinto, L.D.S. *Bauhinia* lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *19*, 811–820. [\[CrossRef\]](#)
20. Oliveira, W.F.; Santos, N.R.M.; Cabrera, M.P.; Ferreira, S.A.O.; Raposo, B.L.; Napoleao, T.H.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B.; Cabral Filho, P.E.; Fontes, A.; et al. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobes for biological studies: Application to red blood cell. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8*, 7. [\[CrossRef\]](#)
21. Coelho, L.C.B.B.; Silva, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 295–300. [\[CrossRef\]](#)
22. Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Silva, M.B.R.; Coelho, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *146*, 486–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Ramos, S.A.F.; Silva, L.C.N.; Correia, M.T.S.; Araújo, J.M.; Coelho, L.C.B.B. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. *Afric. J. Microbiol. Res.* **2016**, *10*, 600–607. [\[CrossRef\]](#)
24. Araújo-Melo, R.O.; Souza, I.F.A.C.; Oliveira, C.V.J.; Araújo, J.M.; Sena, K.X.F.R.; Coelho, L.C.B.B. Isolation and identification of endophyte microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves, mainly actinobacteria. *Biotechnol. J. Int.* **2017**, *17*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
25. Singh, K.L.; Singh, D.K.; Singh, V.K. Characterization of the molluscicidal activity of *Bauhinia variegata* and *Mimusops elengi* plant extracts against the fascista vector *Lymanaea acuminata*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2012**, *54*, 135–140. [\[CrossRef\]](#)
26. Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer: New York, NY, USA, 1970. [\[CrossRef\]](#)
27. Piana, M.; Zadra, M.; Brum, T.F.; Boligon, A.A.; Gonçalves, A.F.K.; Cruz, R.C.; Freitas, R.B.; Canto, G.S.; Athayde, M.L. Analysis of Rutin in the Extract and Gel of *Viola tricolor*. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51*, 406–411. [\[CrossRef\]](#)
28. Santos, C.A.; Passos, A.M.P.R.; Andrade, F.C.; Camargo, E.A.; Estevam, C.S.; Santos, M.R.V.; Thomazzi, S.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 6. [\[CrossRef\]](#)
29. Pena, R.V.; Machado, R.C.; Caixeta, M.B.; Araújo, P.S.; Oliveira, E.C.; Silva, S.M.; Rocha, T.L. Lauric acid bilayer-functionalized iron oxide nanoparticles disrupt early development of freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Acta Trop.* **2022**, *229*, 106362. [\[CrossRef\]](#)
30. Oliveira-Filho, E.C.; Geraldino, B.R.; Coelho, D.R.; Carvalho, R.R.; Paumgarten, F.J.R. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere*. **2010**, *8*, 219–227. [\[CrossRef\]](#)
31. 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.; et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere*. **2015**, *132*, 188–192. [\[CrossRef\]](#)
32. Araújo, H.D.A.; Silva, L.R.S.; Siqueira, W.N.; Fonseca, C.S.M.; Silva, N.H.; Melo, A.M.M.A.; Martins, M.C.B.; Lima, V.L.M. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* **2018**, *179*, 39–43. [\[CrossRef\]](#)
33. Araújo, P.S.; Caixeta, M.B.; Brito, R.D.S.; Gonçalves, B.B.; Silva, S.M.; Lima, E.C.O.; Silva, L.D.; Bezerra, J.C.B.; Rocha, T.L. Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: Implications for control of intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* **2020**, *211*, 105644. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Burić, P.; Jakšić, Ž.; Štajner, L.; Sikirić, M.D.; Jurašin, D.; Cascio, C.; Calzolari, L.; Lyons, D.M. Effect of silver nanoparticles on Mediterranean Sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. *Mar. Environ. Res.* **2015**, *111*, 50–59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Batista, J.J.; Araújo, H.D.A.; Aguiar, T.W.A.; Ferreira, S.A.O.; Lima, M.V.; Pereira, D.R.; Ferreira, M.R.A.; Soares, L.A.L.; Melo, A.M.M.A.; Albuquerque, M.C.P.A.; et al. Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818—Intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. *Acta Trop.* **2022**, *228*, 106312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Araújo, H.D.A.; Silva, H.A.M.F.; Siqueira, W.N.; Santos, V.H.B.; Lima, M.V.; Silva Júnior, J.G.; Silva, N.H.; Albuquerque, M.C.P.A.; Melo, A.M.M.A.; Aires, A.L.; et al. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) infected and not infected with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* **2021**, *222*, 106067. [\[CrossRef\]](#)
37. Oyeyemi, O.T. Application of nanotized formulation in the control of snail intermediate hosts of schistosomes. *Acta Trop.* **2021**, *220*, 105945. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Pereira, L.P.L.A.; Ribeiro, E.C.G.; Brito, M.C.A.; Silveira, D.P.B.; Araruna, F.O.S.; Araruna, F.B.; Leite, J.A.C.; Dias, A.A.S.; Firmo, W.D.C.A.; Borges, M.O.D.R.; et al. Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails—A review. *Acta Trop.* **2020**, *209*, 105489. [\[CrossRef\]](#)
39. Kiros, G.; Erko, B.; Giday, M.; Mekonnen, Y. Laboratory assessment of molluscicidal and cercariacidal effects of *Glinus lotoides* fruits. *BCM Res. Notes*. **2014**, *7*, 220. [\[CrossRef\]](#)
40. Ribeiro, I.A.T.A.; Sá, J.L.F.; Lima, M.V.; Veras, S.T.S.; Aguiar, J.C.R.O.F.; Aires, A.L.; Albuquerque, M.C.P.A.; Da Silva, M.V.; Melo, A.M.M.A.; Navarro, D.M.A.F.; et al. Toxic effect of *Croton rudolphianus* leaf essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae and *Artemia salina*. *Acta Trop.* **2021**, *223*, 106102. [\[CrossRef\]](#)

41. Chifundera, K.; Baluku, B.; Mashimango, B. Phytochemical screening and molluscicidal potency of same zairean medicinal plants. *Pharmacol. Res.* **1993**, *28*, 333–340. [\[CrossRef\]](#)
42. Hymete, A.; Iversen, T.H.; Rohloff, J.; Erko, B. Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 675–679. [\[CrossRef\]](#)
43. Ibrahim, A.M.; Bakry, F.A. Assessment of the molluscicidal impact of extracted chlorophyllin on some biochemical parameters in the nervous tissue and histological changes in *Biomphalaria alexandrina* and *Lymnaea natalensis* snails. *Invert. Neurosci.* **2019**, *19*, 7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dai, L.; Wang, W.; Dong, X.; Hu, R.; Nan, X. Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 226–232. [\[CrossRef\]](#)
45. Augusto, R.C.; Friani, G.; Vasconcellos, M.C.; Rodrigues, M.L.A.; Mello-Silva, C.C. *Schistosoma mansoni*: Phytochemical effect on aquatic life cycle. *J. Vet. Med.* **2015**, *5*, 127–132. [\[CrossRef\]](#)
46. Jaqueline, L.M.; Silva, K.R.; Paula, L.A.L.; Cunha, W.R.; Ramos, S.B.; Rodrigues, V.; Cabral, F.J.; Magalhaes, L.G. Molluscicidal and cercaricidal activities of curcumin on *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Pest. Manag. Sci.* **2020**, *76*, 1228–1234. [\[CrossRef\]](#)
47. Rizk, M.Z.; Metwally, N.S.; Hamed, M.A.; Mohamed, A.M. Correlation between steroid sex hormones, egg laying capacity and cercarial shedding in *Biomphalaria alexandrina* snails after treatment with *Haplophyllum tuberculatum*. *Exp. Parasitol.* **2012**, *132*, 171–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Oehlmann, J.; Fioroni, P.; Stroben, E.; Markert, B. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci. Total Environ.* **1996**, *188*, 205–223. [\[CrossRef\]](#)
49. Lima, M.V.; Pereira, M.I.A.; Cabral Filho, P.E.; Siqueira, W.N.; Silva, H.A.M.F.; França, E.J.; Santos, B.S.; Melo, A.M.M.A.; Fontes, A. Studies on toxicity of suspensions of CdTe quantum dots to *Biomphalaria Glabrata* Mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* **2019**, *38*, 2128–2136. [\[CrossRef\]](#)
50. Parry, H.E.; Pipe, R.K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* **2004**, *20*, 311–325. [\[CrossRef\]](#)
51. Perez, D.G.; Fontanetti, C.S. Hemocitological responses to environmental stress in invertebrates: A review. *Environ. Monit. Assess.* **2011**, *177*, 437–447. [\[CrossRef\]](#)
52. Melillo, D.; Marino, R.; Italiani, P.; Boraschi, D. Innate immune memory in invertebrate metazoans: A critical appraisal. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 17. [\[CrossRef\]](#)
53. Burgos-Aceves, M.A.; Abo-Al-El, H.G.; Faggio, C. Impact of phthalates and bisphenols plasticizers on haemocyte immune function of aquatic invertebrates: A review on physiological, biochemical, and genomic aspects. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *419*, 9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Wyllie, A.H. “Where, O death, is thy sting?” A brief review of apoptosis biology. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *42*, 4–9. [\[CrossRef\]](#)
55. Afanasieva, K.; Sivolob, A. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophys. Chem.* **2018**, *238*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Siqueira, W.N.; França, E.J.; Pereira, D.R.; Lima, M.V.; Silva, H.A.M.F.; Araújo, H.D.A.; Sá, J.L.F.; Melo, A.M.M.A. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Chemosphere* **2020**, *249*, 126218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Tuteja, N.; Singh, M.B.; Misra, M.K.; Bhalla, P.L.; Tuteja, R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: Progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *36*, 337–397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Bianchi, J.; Cabral-De-Mello, D.C.; Marin-Morales, M.A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *120*, 174–183. [\[CrossRef\]](#)
59. Barzilai, A.; Yamamoto, K.I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1109–1115. [\[CrossRef\]](#)
60. Ibrahim, A.M.; Ahmed, A.K.; Bakry, F.A.; Rabei, I.; Abdel-Ghaffar, F. Toxicological impact of butralin, glyphosate-isopropylammonium and pendimethalin herbicides on physiological parameters of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Mol. Res.* **2019**, *39*, 224–233. [\[CrossRef\]](#)
61. Siqueira, W.N.; França, E.J.; Pereira, D.R.; Lima, M.V.; Silva, H.A.M.F.; Sá, J.L.F.; Araújo, H.D.A.; Melo, A.M.M.A. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2021**, *28*, 69343–69353. [\[CrossRef\]](#)
62. Morad, M.Y.; El-Sayed, H.; Elhenawy, A.A.; Korany, S.M.; Aloufi, A.S.; Ibrahim, A.M. Myco-synthesized molluscicidal and larvicidal selenium nanoparticles: A new strategy to control *Biomphalaria alexandrina* snails and larvae of *Schistosoma mansoni* with an in silico study on induced oxidative stress. *J. Fungi.* **2022**, *8*, 262. [\[CrossRef\]](#)
63. Ibrahim, A.M.; Ghoname, S.I. Molluscicidal impacts of *Anagallis arvensis* aqueous extract on biological, hormonal, histological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Exp. Parasitol.* **2018**, *192*, 36–41. [\[CrossRef\]](#)
64. Levi-Schaffer, F.; Tarrab-Hazdai, R.; Meshulam, H.; Arnon, R. Effect of phosphonium salts and phosphoranes on the acetylcholinesterase activity and on the viability of *Schistosoma mansoni* parasites. *Int. J. Immunopharmacol.* **1984**, *6*, 619–627. [\[CrossRef\]](#)
65. Araújo, H.D.A.; Melo, A.M.M.A.; Siqueira, W.N.; Martins, M.C.B.; Aires, A.L.; Albuquerque, M.C.P.A.; Silva, N.H.; Lima, V.L.M. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta Trop.* **2018**, *188*, 132–137. [\[CrossRef\]](#)

66. World Health Organization. Research priorities for Helminth infections. Technical report on the TDR disease reference group on Helminth infections, in: World Health Organization. *Tech. Rep. Ref. Ser.* **2012**, 972, 79.
67. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
68. Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Biochem. Biotechnol.* **1992**, *36*, 113–118. [[CrossRef](#)]
69. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Caixeta, M.B.; Araújo, P.S.; Pereira, A.C.; Tallarico, L.F.; Rocha, T.L. *Biomphalaria* embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing standard protocols. *Sci. Total Environ.* **2022**, *833*, 155211. [[CrossRef](#)]
71. Pavlica, M.; Klobučar, G.; Vetma, N.; Erben, R.; Papeš, D. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2000**, *465*, 145–150. [[CrossRef](#)]
72. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **1988**, *175*, 184–191. [[CrossRef](#)]
73. Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 143–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Araújo, H.D.A.; Silva, L.R.S.; Siqueira, W.N.; Fonseca, C.S.M.; Nicacio, H.S.; Melo, A.M.M.A.; Martins, M.C.B.M.; Lima, V.L.M.L. 2018. Dataset on usnic acid from *Cladonia substellata* Vainio (Lichen) schistosomiasis mansonii's vector control and environmental toxicity. *Data Brief* **2008**, *17*, 288–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. CONCLUSÃO

O extrato salino e fração de *B. monandra* são candidatos promissores para o controle da infecção por *S. mansoni*, pois ambos têm efeito moluscicida contra *B. glabrata*, cercaricidas, além de apresentarem baixa toxicidade ambiental em relação ao moluscicida comercial niclosamida. A utilização de *B. monandra* como novo moluscicida depende de pesquisas futuras que comprovem sua ação e segurança ambiental em condições de campo em larga escala.

ANEXO A – RESUMOS ENVIADOS PARA EVENTOS CIENTÍFICOS

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq - 2022

Toxicity Evaluation of *Bauhinia monandra* Fraction Containing Phytochemicals and Leaf Lectin (BmoLL) on Embryos of *Biomphalaria glabrata*

Aguiar, T.W.A.¹, Batista, J.J.¹, Ferreira, S.A.O.², Ferreira, M.R.A.³, Soares, L.A.L.³, Melo, A.M.M.A.⁴, Albuquerque, M.C.P.A.⁵, Araújo, H.D.A.¹, Aires, A.L.⁵, Coelho, L.C.B.B.¹.

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, PE, Brazil;

²Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil; ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFPE, Recife, PE, Brazil; ⁴Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCS, UFPE, Recife, PE, Brazil; ⁵Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, CCM, UFPE, Recife, PE, Brazil.

INTRODUCTION: *Biomphalaria glabrata* mollusks are the main vector of schistosomiasis in Brazil and plants of the *Bauhinia* genus are widely found in endemic continents for the disease; leaves of *Bauhinia monandra* contain a BmoLL lectin with biocidal action. **OBJECTIVES:** To analyze the fraction (F) from leaves of *B. monandra* and the embryotoxic effect on *B. glabrata*. **MATERIALS AND METHODS:** F was obtained with powder from *B. monandra* leaves in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.15 M NaCl which was passed through gauze and centrifuged. Ammonium sulfate (60%) was added to precipitate proteins; the material was kept under gentle agitation, centrifuged and lyophilized. Secondary metabolites were investigated by thin-layer chromatography (TLC); quantitative protein, hemagglutinating activity (HA) and specific HA (SHA) were evaluated. *B. glabrata* embryos at blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stages (300 of each) were exposed to F for 24 h at different concentrations (12.5-600 µg/mL). Subsequently, the embryos were washed and transferred to plates with filtered and dechlorinated water, analyzed with a magnifying glass for their viable (normal) and unviable forms (malformations and death). **RESULTS:** TLC detected cinnamic derivatives and flavonoids; protein concentration (2.5 mg/ml) and SHA (809.6) confirmed the lectin presence. In the concentration of 100 µg/ml, F provided 65% and 88% of unviable blastula and gastrula, respectively, while at 200 µg/ml 100% of unviable embryos were observed for both stages. In trochophore 400 and 600 µg/ml of F made 95.7% and 100% of non-viable embryos. At the same F concentrations, the veliger and hippo stages showed unviability of 92.7% and 75.3%, respectively, and 100% of malformations and/or deaths at 600 µg/ml. **CONCLUSIONS:** F showed teratogenic/toxic effects in all evolutionary stages of *B. glabrata*, proving to be an efficient molluscicide.

Keywords: lectin, embryotoxicity, schistosomiasis.

Funding: CNPq, FACEPE.

45° Reunião anual SBBF, 50° Reunião anual SBBq, 13° Congresso anual SBBN
e 20° Congresso IUPAB – 2021.



ANEXO B – PREMIAÇÃO

45° Reunião anual SBBF, 50° Reunião anual SBBq, 13° Congresso anual SBBN e 20° Congresso IUPAB – 2021.



ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO

Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 – intermediate host) and cercaricide activity Against the infectious agente of schistosomiasis. Acta tropica, 2022,



Acta Tropica
Volume 228, April 2022, 106312



Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 – intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis

José Josenildo Batista ^a, Hallysson Douglas Andrade de Araújo ^a, Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar ^a

, Sílvia Assis de Oliveira Ferreira ^a, Maíra de Vasconcelos Lima ^b, Dewson Rocha Pereira ^b

, Magda Rhayanny Assunção Ferreira ^c, Luiz Alberto Lira Soares ^c, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo ^b

, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque ^{d, e}, André de Lima Aires ^{d, e}

, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho ^a  