UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

WILZA WANESSA MELO FRANÇA

"Toxicidade da plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4- naphthoquinone) contra estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*"

Recife
2022

WILZA WANESSA MELO FRANÇA

"Toxicidade da plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4- naphthoquinone) contra estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfologia e Inovação Tecnológica

Orientador (a): Prof Dr. André de Lima Aires

Coorientador (a): Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo
Coorientador (a): Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva

Recife

2022

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

França, Wilza Wanessa Melo
"Toxicidade da plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4- naphthoquinone) contra estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*" / Wilza Wanessa Melo França. – 2022.

109 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires.
Coorientador: Dr. Hallysson Douglas de Andrade Araújo.
Coorientadora: Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Esquistossomose. 2. *Schistosoma mansoni.* 3. Toxicologia. I. Aires, André de Lima (orientador) II. Araújo, Hallysson Douglas de Andrade (coorientador). III. Silva, Hianna Arely Milca Fagundes (coorientadora). IV. Título.

616.963 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2022-148

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Toxicidade da plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4- naphthoquinone) contra estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 25/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. André de Lima Aires
(Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Eliete Cavalcanti da Silva
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
(Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo em minhas escolhas, confiando em minha capacidade e dedicação para alcançar qualquer coisa que eu possa desejar.

Ao Prof. Dr André de Lima Aires por todo suporte, orientação e paciência, mesmo quando necessário passar o dia inteiro ou ficar até tarde para finalizar a revisão. Agradeço por todos os ensinamentos, pelo incentivo e principalmente pela amizade.

Aos meus coorientadores Dr. Hallysson Douglas de Andrade Araújo e Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva pelo acompanhamento e orientação nos experimentos e escrita do material. Foi muito bom poder contar com vocês para sanar as milhares de duvidas e me socorrer quando as coisas davam errado

À Profa Dra Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo e sua equipe pela estrutura e apoio no desenvolvimento de todas as etapas que ocorreram no departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

À Profa Dra Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho Pelas sugestões no conteúdo do material e pela correção do material em inglês.

Ao Dr. Dewson Rocha Pereira pelo desenvolvimento do ensaio cometa, um diferencial para meu manuscrito.

Às professoras Ana Lisa do Vale Gomes e Isabella Macario pela orientação, correções e dicas durante meu estágio em docência.

Às alunas de iniciação científica Adriana Maria da Silva e Emily Gabriele Marques Diniz que me acompanharam durante todos os experimentos, e que foram extremamente importantes para obtenção dos nossos resultados.

Aos outros mestrandos trabalhando com os benditos caramujos, Josenildo, João Victor e Thierry pela ajuda, companhia e momentos de descontração (e fofocas) durante esses dois anos de jornada.

Á toda equipe de pesquisa sobre *Schistosoma mansoni* do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) vinculada aos professores Dra. Mônica Camelo e Dr. André Aires, que sempre ajudam uns aos outros independentemente de a quem pertença os projetos.

Á Disciplina de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, e ao LIKA por toda infraestrutura necessária no desenvolvimento da

pesquisa.

À toda equipe de funcionários de ambos os locais por todo apoio técnico necessário.

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo o período do mestrado.

À minha família por todo apoio e fé que me impulsionaram a seguir adiante na jornada da que não foi fácil.

Aos meus amigos por compartilharem os momentos de surtos, tristezas e alegrias.

Á minha sanidade mental que se manteve firme (ou quase) mesmo nesses tempos malucos de pandemia.

E a todos que influenciaram direta ou indiretamente em minha formação acadêmica e como pessoa, meu muito obrigada.

RESUMO

A esquistossomose acomete 236.6 milhões de pessoas em regiões e tropicais e subtropicais do mundo. Caramujos do gênero *Biomphalaria* spp. São o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no Brasil. Assim, na ausência de vacinas e políticas sanitárias eficazes, uma das estratégias para reduzir a esquistossomose, preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o controle populacional do molusco *B. glabrata*. Dessa forma, buscou-se avaliar a toxicidade da plumbagina sobre caramujos adultos do *B. glabrata* e cercárias do *S. mansoni*. Para a verificação da atividade moluscicida da plumbagina foram utilizados caramujos adultos da espécie *B. glabrata* e embriões nos estádios de gástrula, blástula, trocófora, véliger e hippo stage. Os animais adultos foram expostos a plumbagina nas concentrações de 2-4 µg/mL por 24 h. Os embriões foram selecionados e expostos às concentrações de 0,3-0,2 µg/mL por 24 h. Ambos os grupos foram lavados e observados por 7 dias após a exposição, e os adultos foram observados quanto a parâmetros de fertilidade e fecundidade. A análise da atividade cercaricida foi realizada por meio da exposição de cercárias (cepa Belo Horizonte) à plumbagina nas concentrações de 1-3 µg/mL, sendo estas avaliadas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. A toxicidade ambiental sobre *Artemia salina* foi verificada por exposição dos náuplios às concentrações de 0,5-2,75 µg/mL por 24 horas. A plumbagina demonstrou atividade moluscicida a baixas concentrações contra embriões (LC90 de 0,84, 1,35, 0,96, 0,70 e 1,06 µg/mL respectivamente) e contra adultos (LC90 de 4,34 µg/mL), após 24 h de exposição. Não foi possível observar alterações na fecundidade ou fertilidade dos caramujos expostos. A plumbagina foi capaz de aumentar a frequência de danos no DNA e o número de hemócitos, sendo a apoptose e a binucleação as principais alterações identificadas. Na exposição das cercárias à plumbagina foi possível observar 100% de letalidade na concentração de 1 µg/mL em 120 minutos e nas demais concentrações a partir de 60 minutos, com menor toxicidade para *A. salina*, quando comparada com niclosamida. Em concentrações inferiores às preconizadas pela OMS, plumbagina apresentou ação moluscicida sobre *B. glabrata* e ação cercaricida sobre cercárias de *S. mansoni*. Assim, plumbagina pode representar alternativa promissora no controle da infecção pelo *S. mansoni*.

Palavras-chave: Cometa; Embriões; Hemócitos; Moluscicida; Naftoquinona.

ABSTRACT

Schistosomiasis affects 236.6 million people in tropical and subtropical regions of the world. Snails of the genus *Biomphalaria spp*. They are the main intermediate host of *S. mansoni* in Brazil. Thus, in the absence of vaccines and effective health policies, one of the strategies to reduce schistosomiasis, recommended by the World Health Organization (WHO) is population control of the mollusc *B. glabrata*. Thus, we sought to evaluate the toxicity of plumbagin on adult snails of *B. glabrata* and cercariae of *S. mansoni*. To verify the molluscicidal activity of plumbagin, adult snails of the species *B. glabrata* and embryos in the gastrula, blastula, trochophore, veliger and hippo stage were used. Adult animals were exposed to plumbagin at concentrations of 2-4 µg/mL for 24 h. Embryos were selected and exposed to concentrations of 0.3-0.2 µg/mL for 24 h. Both groups were washed and observed for 7 days after exposure, and adults were observed for fertility and fecundity parameters. The analysis of cercaricidal activity was performed by exposing cercariae (Belo Horizonte strain) to plumbagin at concentrations of 1-3 µg/mL, which were evaluated at 15, 30, 60 and 120 minutes. The environmental toxicity on *Artemia salina* was verified by exposing the nauplii to concentrations of 0.5-2.75 µg/mL for 24 hours. Plumbagin demonstrated molluscicidal activity at low concentrations against embryos (LC90 of 0.84, 1.35, 0.96, 0.70 and 1.06 µg/mL respectively) and against adults (LC90 of 4.34 µg/mL), after 24 h of exposure. It was not possible to observe changes in the fecundity or fertility of exposed snails. Plumbagin was able to increase the frequency of DNA damage and the number of hemocytes, with apoptosis and binucleation being the main alterations identified. In the exposure of cercariae to plumbagin, it was possible to observe 100% lethality at a concentration of 1 µg/mL in 120 minutes and at other concentrations from 60 minutes onwards, with less toxicity to *A. salina*, when compared to niclosamide. At concentrations lower than those recommended by the WHO, plumbagin had a molluscicidal action on *B. glabrata* and a cercaricidal action on cercariae of *S. mansoni*. Thus, plumbagin may represent a promising alternative in the control of *S. mansoni* infection.

Keywords: Comet. Embryos. Hemocytes. Molluscicide. naphthoquinone.

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Distribuição mundial das espécies de *Schistosoma* com importância em saúde pública 19

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose em áreas endêmicas no Brasil por faixa de positividade e por município, 2009-2017 20

Figura 3 - Fluxo de pacientes com esquistossomose na cidade do Recife, oriundos de municípios endêmicos do estado de Pernambuco no qual ocorreu infecção, Pernambuco, 2007-2013 21

Figura 4 - Mapa da distribuição de hospedeiros intermediários do *Schistosoma. mansoni* em regiões do estado de Pernambuco 21

Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de casal de vermes de *Schistosoma mansoni* acasalados 23

Figura 6 - Fases evolutivas do *S. mansoni* 24

Figura 7 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* 25

Figura 8 - Apresentação clínica da esquistossomose 27

Figura 9- Estrutura química do Praziquantel 29

Figura 10 - Hospedeiros de diferentes espécies de *Schistosoma* 31

Figura 11 - Espécies de *Biomphalaria spp*. 32

Figura 12 - Morfologia externa de caramujos do gênero de *Biomphalaria* 33

Figura 13 - Estruturas de importância anatômica do *B. glabrata.* 35

Figura 14 - Diferentes estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*: 39

Figura 15 - Distribuição dos hospedeiros intermediários no Brasil. 40

Figura 16 - Estrutura química da niclosamida. 42

Figura 17- Estrutura química das classes de quinonas naturais. 44

Figura 18- Estrutura química da Plumbagina. 46

Figura 19 - Algumas das espécies de plantas citadas das quais é possível extrair a Plumbagina. 48

Figura 20- *Artemia salina*. 50

ARTIGO- TOXIC, CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF PLUMBAGIN IN THE DEVELOPMENTAL STAGES OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818 - INTERMEDIATE HOST) AND CERCARICIDAL ACTIVITY AGAINST THE INFECTIOUS AGENT OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI

Fig. 1 - Chemical structure of plumbagin. 82

Fig. 2 - Toxicity of plumbagin on embryonic stages of *B. glabrata*. 83

Fig. 3 - *B. glabrata* embryos exposed to 0.5% dimethylsufoxide in filtered and dechlorinated water, niclosamide and plumbagin. 84

Fig. 4 - Mortality rate (A) and fecundity and fertility (B) of adults of *B. glabrata* exposed to plumbagin. 85

Fig. 5 - *B. glabrata* hemocytes.....85

Fig. 6 - Morphological and quantitative alterations of *B. glabrata* hemocytes exposed to plumbagin. 86

Fig. 7 - Comet assay images obtained from *Biomphalaria glabrata* hemocytes, and DNA damage after exposure to different concentrations of plumbagin. 87

Fig. 8 - DNA damage of *B. glabrata* hemocytes determined by the comet assay. 87

Fig. 9 - *Schistosoma mansoni* cercariaes.....88

Fig. 10 - *Artemia salina* survival rate 88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO- TOXIC, CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF PLUMBAGIN IN THE DEVELOPMENTAL STAGES OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818 - INTERMEDIATE HOST) AND CERCARICIDAL ACTIVITY AGAINST THE INFECTIOUS AGENT OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI

Table 1 - Lethal concentrations (LC) of plumbagin (µg/mL) after 24 h of exposure on embryos and adults of *Biomphalaria glabrata* and *Arthemia salin*…….....80

Table 2 - Plumbagin activity on *Schistosoma mansoni* cercariae by exposure time (15 – 120 minutes)……80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância

APO - Amebocyte Producing Organ

BH – Belo Horizonte

C – Controle H2O

C+DMSO – Controle H2O + Dimetilsufóxido 0.5%

CA – Califórnia

Ca2+ - ion Cálcio

CDC – Center of Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CL10, CL 50 e CL 90 – Concentrações Letais em 10%, 50% e 90% da população

DMSO - Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima)

EROs - espécies reativas de oxigênio

HCV - vírus da hepatite C

IFI - Imunofluorescência indireta

Log - Logaritmo

MG – Minas Gerais

MO - Missouri

NCL - niclosamida

nM - Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB - Plumbagina

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PZQ - Praziquantel

S. - *Schistosoma*

Sinan - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

USA – United States of America. Estados Unidos da América

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE 18

2.2 *SCHISTOSOMA MANSONI* 21

2.2.1 Origem e Características biológicas do *Schistosoma mansoni* 21

2.2.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* 24

2.2.3 Sintomatologia e patogênese da esquistossomose 26

2.2.4 Diagnóstico, Tratamento e Profilaxia da esquistossomose 29

2.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DO *SCHISTOSOMA MANSONI* 30

2.3.1 O gênero *Biomphalaria* 32

2.3.2 Características embrionárias 38

2.3.3 Distribuição geográfica 39

2.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE 40

2.4.1 Controle populacional do *Biomphalaria glabrata* 42

2.5 QUINONAS DE ORIGEM NATURAL 43

2.5.1 Plumbagina 46

2.6 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS 49

2.6.1 Bioensaio com *Artemia salina* 50

3 OBJETIVOS 52

3.1 OBJETIVO GERAL 52

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52

4 MATERIAIS E MÉTODOS 53

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* 53

4.2 DROGAS 53

4.3 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *SCHISTOSOMA MANSONI* 53

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE EMBRIÕES DA *BIOMPHALARIA GLABRATA* 53
4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CARAMUJOS ADULTOS DE *B. GLABRATA* 54
4.6 ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ANOMALIAS NUCLEARES NOS HEMÓCITOS DE CARAMUJOS ADULTOS *B. GLABRATA* EXPOSTOS A PLUMBAGINA 54
4.7 ENSAIO COMETA 55
4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE *S. MANSONI* 56
4.9 AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE AMBIENTAL DA PLUMBAGINA SOBRE *ARTEMIA SALINA* 57
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 57
5 ARTIGO- TOXIC, CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECT OF PLUMBAGIN IN THE DEVELOPMENTAL STAGES OF *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818 - INTERMEDIATE HOST) AND CERCARICIDAL ACTIVITY AGAINST THE INFECTIOUS AGENT OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI. 59
6 CONCLUSÃO 89
REFERÊNCIAS.....90
ANEXO A - CARTA DE SUBMISSÃO 103
ANEXO B - PÁGINA DE SUBMISSÃO DA PLATAFORMA DO PERIÓDICO.....104
ANEXO C - DETALHES DO ARTIGO NA PLATAFORMA DE SUBMISSÃO.....106

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose foi responsável por 236,6 milhões de pessoas infectadas no ano de 2019, sendo uma doença infecto-parasitária que se manifesta de forma aguda e crônica. Esta parasitose ocupa o segundo lugar entre as doenças parasitárias de maior importância com relação à morbidade e mortalidade no mundo, atrás apenas da malária (BRITO, 2012; OMS, 2021). Os agentes etiológicos da esquistossomose são vermes trematódeos do gênero *Schistosoma spp.*, com destaque para a espécie responsável por causar a esquistossomose nas Américas, o *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907), sendo endêmica em 54 países tropicais e subtropicais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A transmissão do *S. mansoni* depende do contato com coleções hídricas onde habitam caramujos infectados liberando cercárias, fase infectante para o hospedeiro definitivo, o homem. As espécies *Biomphalaria tenagophila*, presente do litoral da Bahia ao Rio Grande do sul*, B. straminea,* com maior distribuição ao longo do território nacional, e *B. glabrata,* nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, atuam como hospedeiro intermediário, responsáveis pelo êxito no desenvolvimento da parasitose no Brasil (KATZ, 2018).

Como formas de combate à esquistossomose, a Organização mundial da saúde (OMS) preconiza o tratamento periódico e em larga escala com Praziquantel, o acesso à água potável e saneamento básico e o controle dos hospedeiros intermediários (OMS, 2021). Esse controle pode ser realizado através do uso de moluscicidas, substâncias usadas para controlar e/ou exterminar moluscos de importância econômica na agronomia e na medicina humana, como no caso dos vetores de *S. mansoni* (MCCULLOUGH, 1992; SOKOLOW et al., 2016). Um dos critérios estabelecidos pela OMS para um moluscicida ideal é sua embriotoxicidade, de modo que seja capaz de matar embriões do caramujo antes da eclosão dos ovos (OMS, 1965). Outros autores defendem que concentrações letais para caramujos adultos, mesmo que não matem embriões imediatamente, ainda podem causar malformações e alterações que impeçam a eclosão ou matem os embriões mesmo após a aplicação (DE ARAÚJO et al., 2018; DUNCAN; STURROCK, 1987; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2019)

Atualmente, a niclosamida é o único moluscicida recomendado pela OMS, porém apresenta baixa seletividade biocida, elevado custo para aplicação e dificuldade de transporte (OMS, 2017). Assim, é necessária a pesquisa e a busca por novos agentes moluscicidas que apresentem atividade seletiva contra os caramujos alvos em concentrações atóxicas para a fauna e flora locais, com um bom custo benefício e de fácil aplicação (LARDANS; DISSOUS, 1998; RAPADO et al., 2013; SOKOLOW et al., 2016; OMS, 2017). Os testes de ecotoxicidade podem ser realizados a partir de diversos organismos como bactérias, algas, peixes e crustáceos, dentre os quais a *Artemia salina* se destaca como modelo amplamente empregado, pois já demonstrou alta sensibilidade para monitoramento ecotoxicológico de novos agentes moluscicida (COSTA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2018a; SILVA et al., 2019a).

A investigação de produtos naturais é uma das principais estratégias para a pesquisa de candidatos a novos fármacos. Produtos naturais já conhecidos, com atividades farmacológicas, biológicas e biossegurança comprovadas, podem ser redirecionados para novos alvos biológicos. Esse redirecionamento pode representar uma economia de bilhões de dólares, mais de 15 anos de investigação, além de menor risco de toxicidade, resistência e/ou tolerância, tornando-se uma questão de grande interesse para a comunidade científica e indústria farmacêutica (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007; BERLINCK et al., 2017;). Neste sentido, as naftoquinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos naturais de grande interesse para a indústria farmacêutica (NILE; PARK, 2014).

A naftoquinona Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), isolada das raízes da planta medicinal *Plumbago indica*, é amplamente distribuída na família *Plumbaginaceae*, possui amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas incluindo ativação da apoptose, ação antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana e antifúngica (PADHYE et al., 2012) e contra *S. mansoni* (LORSUWANNARAT et al., 2013). As naftoquinonas se destacam como promissores antiparasitários, além de possuir derivados ativos contra embriões e caramujos adultos de *B. glabrata* (CAMARA et al., 2008; ZHANG; COULTAS, 2013ª; SANTOS et al., 2020). Estudos demonstraram o efeito de polifenóis, caracterizados por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático, como potenciais moluscicidas. Naftoquinonas como a plumbagina possuem fenol em sua fórmula química,

possivelmente apresentando efeito tóxico semelhante aos polifenóis anteriormente testados (SINGH; YADAV; SINGH, 2010; ARAÚJO et al., 2018a; HASHEESH et al., 2020).

Com base nos pontos discutidos, se faz necessário a busca por agentes moluscicidas alternativos para auxiliar o controle da esquistossomose. Assim, este estudo objetiva avaliar a ação da plumbagina sobre diferentes estágios embrionários (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage) e adultos de *B. glabrata*, seus efeitos genotóxico e citotóxico sobre o caramujo, assim como sua ação sobre cercárias de *S. mansoni* e sobre *Artemia salina,* como bioindicador de ecotoxicidade ambiental.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade moluscicida, citotóxica e genotóxica da plumbagina sobre *Biomphalaria glabrata*, Ação cercaricida contra cercárias *de S. mansoni* e ecotoxicidadde sobre *Artemia salina.*

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da plumbagina sobre embriões de *B. glabrata*, analisando parâmetros embrionários (mortalidade e má-formação) em diferentes estágios evolutivos (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage), após exposição à plumbagina durante 24 horas pelo método de imersão;
- Avaliar a toxicidade da plumbagina sobre caramujos adultos de *B. glabrata* analisando parâmetros de mortalidade e reprodução após exposição aguda à plumbagina durante 24 horas pelo método de imersão;
- Avaliar a citotoxicidade da plumbagina sobre hemócitos de caramujos adultos de *B. glabrata* através da frequência de anomalias nucleares;
- Avaliar a genotoxicidade da plumbagina através de ensaio cometa;
- Avaliar a toxicidade da plumbagina sobre cercárias de *S. mansoni*.
- Avaliar a ecotoxicidade ambiental da plumbagina através de testes com *Artemia salina*;

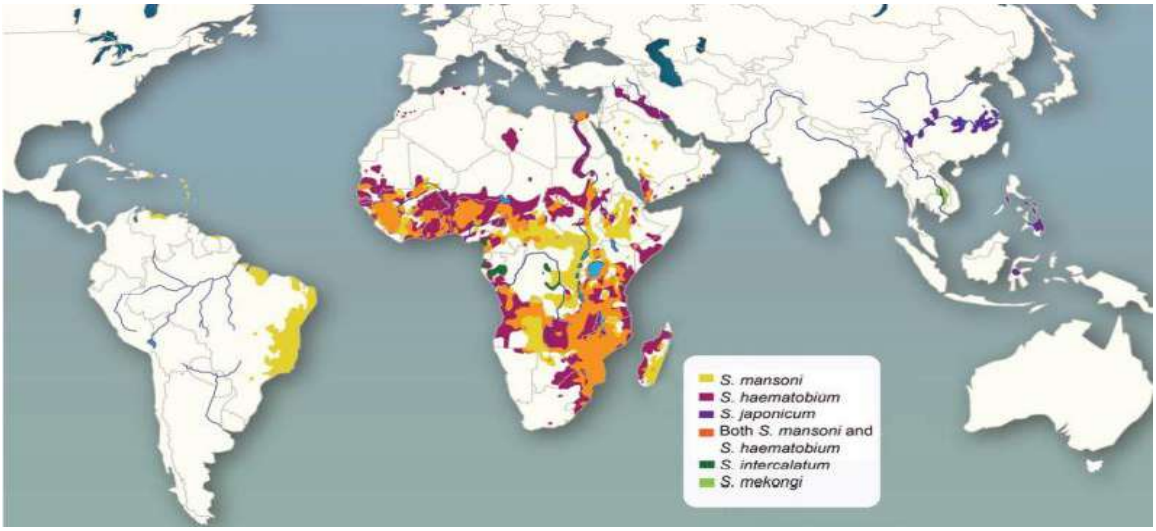
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

Conhecida popularmente no Brasil como Barriga d'água, bilharzíase, doença do caramujo ou xistose, a esquistossomose é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como integrante da lista de Doenças Tropicais negligenciadas (DTN). Segundo a OMS, 236,6 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo no ano de 2019 e estima-se que 90% dos que precisam de tratamento encontram-se na África. Como formas de combate à esquistossomose a OMS preconiza o tratamento periódico e em larga escala com praziquantel, o controle dos hospedeiros intermediários e o acesso à água potável e saneamento básico (OMS, 2021).

Causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, a esquistossomose é prevalente entre 78 países e territórios de clima tropical e subtropical com 700 milhões de indivíduos vivendo em áreas de risco. Dos países atingidos, apenas 52 disponibilizam quimioterapia para a população (OMS, 2021). O gênero *Schistosoma* possui 7 espécies de interesse para a medicina humana, sendo o *Schistosoma haematobium* responsável pela esquistossomose urogenital, principalmente na África, no Oriente Médio e na França. As outras seis espécies, *S. mansoni, S. japonicum, S. mekonji, S. guineensis, S. intercalatum* e *S. malayensis* são as espécies responsáveis pela forma intestinal em diversos países, com destaque para Caribe, Suriname, Venezuela e Brasil nas Américas, grande parte dos países do continente africano e algumas regiões da Ásia como a China (Figura 1) (noya et al., 2015).

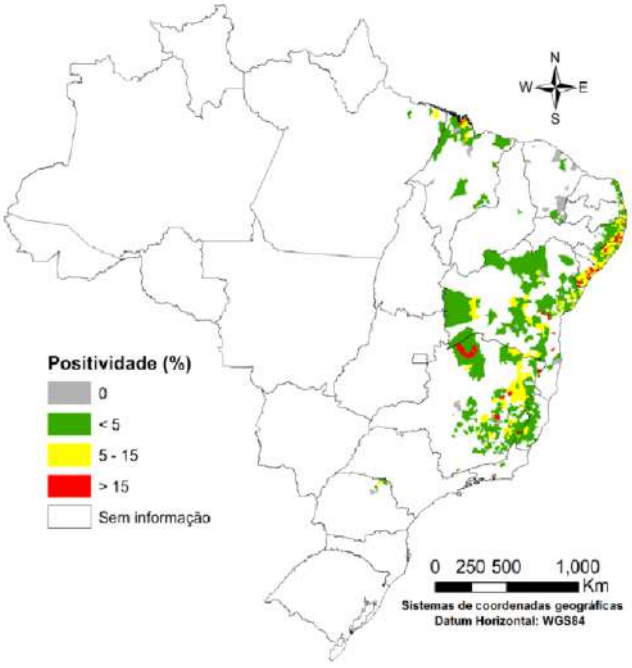
Figura 1 - Distribuição mundial das espécies de *Schistosoma* com importância em saúde pública



Fonte: (WEERAKOON et al., 2015)

A espécie responsável por causar a esquistossomose no Brasil é o *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907), sendo endêmica em 54 países tropicais e subtropicais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A nível nacional, a esquistossomose está presente em 19 estados, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, com 1,5 milhão de pessoas infectadas no país e outros 25 milhões vivendo em regiões de risco de infecção (Figura 2), ou seja, onde é conhecida a presença de hospedeiros intermediários necessários à manutenção e transmissão do parasita (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017; BRASIL, 2017; NOYA et al., 2015). Estima-se uma média anual de 508 óbitos entre os anos de 2006 e 2015 (BRASIL, 2017). Considerando valores utilizados para diagnóstico, internação e tratamento, além de outros custos direta ou indiretamente relacionados, o custo da esquistossomose para o Brasil no ano de 2015 foi de US$ 41,706,337.35 (NASCIMENTO et al., 2019).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose em áreas endêmicas no Brasil por faixa de positividade e por município, 2009-2017

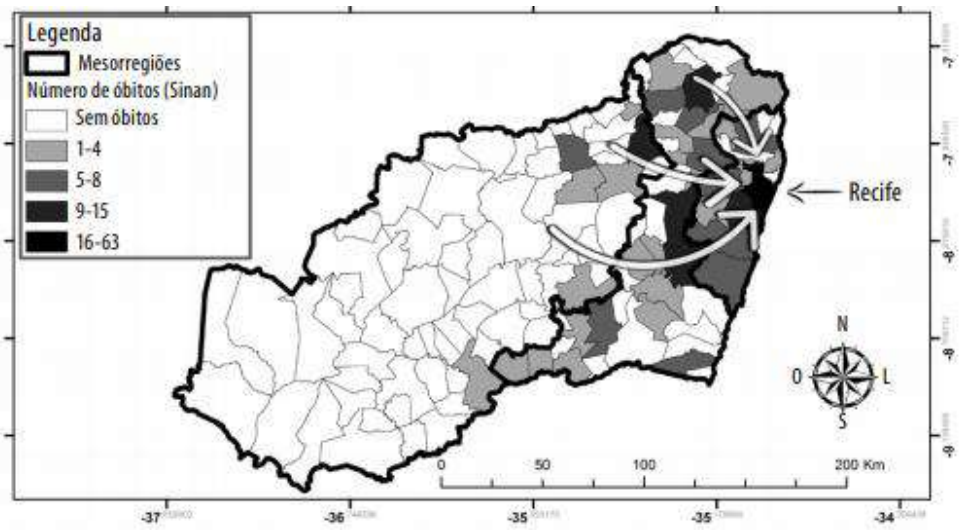


Fonte: (BRASIL, 2017)

É notável a ocorrência contínua dos casos ao longo do litoral do país, distribuindo-se no curso de importantes bacias hidrográficas, sendo Pernambuco um dos principais estados quanto a taxas de incidência, prevalência, internações hospitalares e mortalidade (KATZ, 2018).

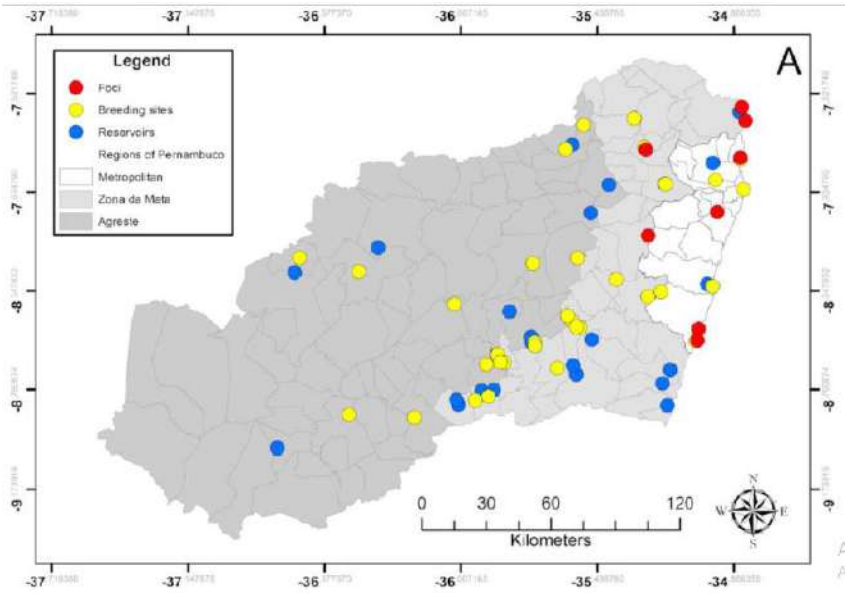
Tradicionalmente considerada uma doença rural no Brasil, nos últimos anos casos de esquistossomose têm sido registrados em localidades periurbanas, urbanas e litorâneas, embora esses possam não indicar contaminação autóctone e sim, migração de indivíduos infectados (Figura 3) (OLIVEIRA et al., 2018). Em Pernambuco a doença se manteve tradicionalmente na zona da m ata do estado, no entanto passou a apresentar casos nas zonas litorâneas (Figura 4) (BARBOSA et al., 2013; DE SOUZA GOMES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Barbosa e colaboradores, ao longo dos anos, publicaram trabalhos relatando surtos de esquistossomose aguda e potenciais focos de infecção do parasita em locais variados da região metropolitana de Recife, com destaque para locais de grande apelo turístico como a praia de Porto de Galinhas (BARBOSA et al., 2001a, 2001b, 2011, 2015a, 2015b, 2016, 2018).

Figura 3 - Fluxo de pacientes com esquistossomose na cidade do Recife, oriundos de municípios endêmicos do estado de Pernambuco no qual ocorreu infecção, Pernambuco, 2007-2013



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). (OLIVEIRA et al., 2018).

Figura 4 - Mapa da distribuição de hospedeiros intermediários do *Schistosoma. mansoni* em regiões do estado de Pernambuco



Fonte: (BARBOSA et al., 2018). Criadouro de caramujos (amarelo), reservas (azul) e focos identificados de transmissão da esquistossomose (vermelho).

2.2 *SCHISTOSOMA MANSONI*

2.2.1 Origem e Características biológicas do *Schistosoma mansoni*

Os primeiros casos de esquistossomose mansônica no Brasil foram descritos por Manoel Pirajá da Silva em 1908, onde relatou a necropsia de 20 pacientes nos quais foram encontrados ovos com espícula lateral e vermes. Suas descrições minuciosas do tamanho e características dos vermes e dos ovos foram fundamentais para diferenciação entre as espécies *Schistosoma haematobium* e *S. mansoni*. Embora Pirajá da Silva tenha sido de fato o primeiro a descrever morfologicamente e de forma completa ambas as formas sexuais dos vermes, foi Sambon que nomeou a espécie em homenagem a Patrick Manson, primeiro pesquisador a encontrar ovos da espécie e levantar a hipótese de existir outro agente causador da bilharziose (KATZ, 2008; NOYA et al., 2015). Já Lutz foi responsável por descrever os hospedeiros intermediários encontrados no Brasil, além de publicar o ciclo do *S. mansoni* no *B. glabrata* e *B. straminea* (NOYA et al., 2015)

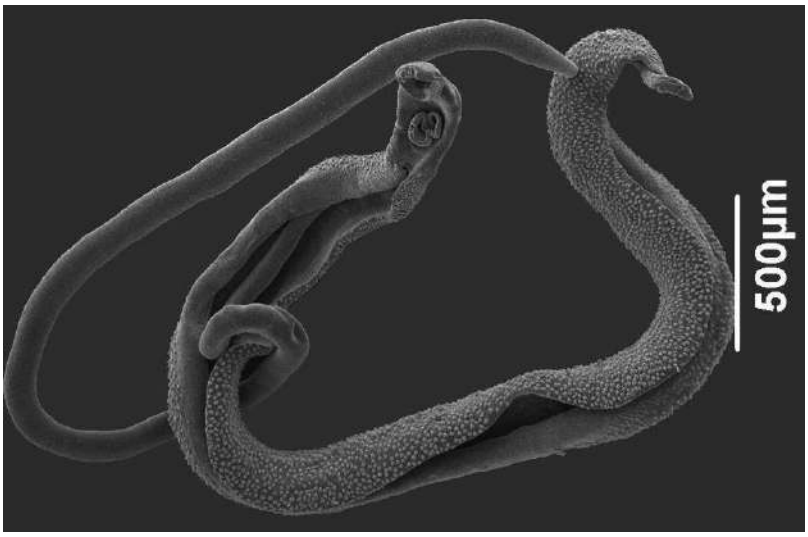
O *S. mansoni,* quanto a classificação taxonômica, pertence ao Reino Animalia, Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, Subclasse Digenea, Ordem Strigeiformes, Família Schistosomatides e Gênero *Schistosoma*. Faz parte da subclasse Digenea devido ao fato de possuir um ciclo de vida heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo evolutivo. O hospedeiro definitivo é o homem, mas outros mamíferos não humanos, como primatas, ruminantes e roedores, podem assumir o papel como hospedeiros permissivos, mantendo o ciclo em ambientes silvestres. Quanto ao hospedeiro intermediário temos caramujos do gênero *Biomphalaria*, moluscos de água doce da classe gastrópode (REY, 2008; GENTILE et al., 2012).

O *Schistosoma mansoni* é um verme trematódeo dióico, possuindo distinção sexual entre macho e fêmea (Figura 5). Os machos tem cor esbranquiçada, medindo cerca de 1 cm e cobertos com tegumento revestido de tubérculos. Possuem uma ventosa oral e acetábulo na porção anterior do corpo e, na porção posterior, as laterais de seu corpo se dobram formando o canal ginecóforo, onde as fêmeas são albergadas e fecundadas (MELO; COELHO, 2016).

Morfologicamente a fêmea (Figura 5), medindo 1,5 cm, é maior que o macho, possui tegumento liso e coloração mais escura em decorrência do sangue semidigerido. Assim como os machos possui uma ventosa oral e um acetábulo na

parte anterior do corpo, e na porção posterior possui corpo cilíndrico onde fica localizado seu sistema reprodutor (MELO; COELHO, 2016). As fêmeas permanecem dentro do canal ginecóforo do macho durante o acasalamento, período em que ocorre a maturação dos vermes e posterior fecundação. Cada fêmea é capaz de produzir aproximadamente 400 ovos diariamente. Destes, metade são eliminados junto com as fezes e a outra é embolizada e depositada nos tecidos, especialmente hepático (LENZI et al., 2008; MACHADO-SILVA; NEVES; GOMES, 2008).

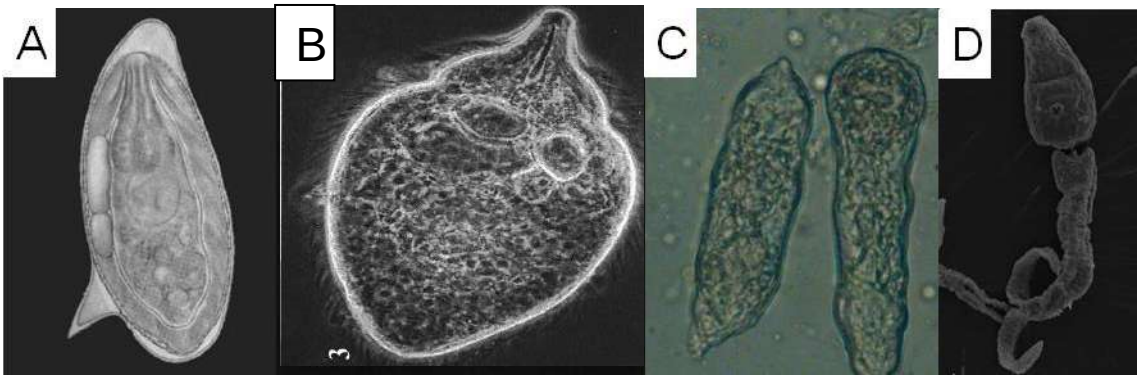
Figura 5 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de casal de vermes de *Schistosoma mansoni* acasalados



Fonte: (AUGUSTO, 2016)

Os ovos (Figura 6A) de *Schistosoma mansoni* tem formato oval, espinho lateral, não operculado, 150 micrômetros de comprimento e 60 de largura e quando maduro há a presença de miracídio em seu interior (MELO; COELHO, 2016). Os miracídios (Figura 6B) tem formato oval, e são revestidos por cílios implantados em células epiteliais, responsáveis por seu deslocamento aquático. Medindo em média 180 micrômetros de comprimento e 64 de largura, e na extremidade anterior possui terebratorium onde estão presentes as glândulas de penetração e os sacos digestivos (MELO; COELHO, 2016).

Figura 6 - Fases evolutivas do *S. mansoni*



Fonte: A- AUGUSTO (2016); B- AUGUSTO (2016); C-(NEGRÃO-CORRÊA et al., 2008); D-AUGUSTO (2016). A- Ovo, B- Miracídio, C- Esporocisto primário e D- Cercária.

O miracídio, quando nos tecidos do caramujo, perde o revestimento epitelial e se torna uma estrutura sacular alongada com paredes culticulares. Com oito dias a larva tem forma de t ubo enovelado cheio de células germinativas em multiplicação, chamado de esporocisto primário (Figura 6C). Dentro dessa estrutura, as células germinativas se desenvolvem em esporocistos de segunda geração, medindo 1,5 mm e de estrutura semelhante. Ao romper, são liberados de 20 a 40 esporocistos filhos (MELO; COELHO, 2016). De 100 a 300 mil cercárias são geradas, com sexos definidos, através de poliembrionia a partir dos esporocistos secundários e liberadas cerca de 4 a 7 semanas após a penetração (FARO et al., 2013).

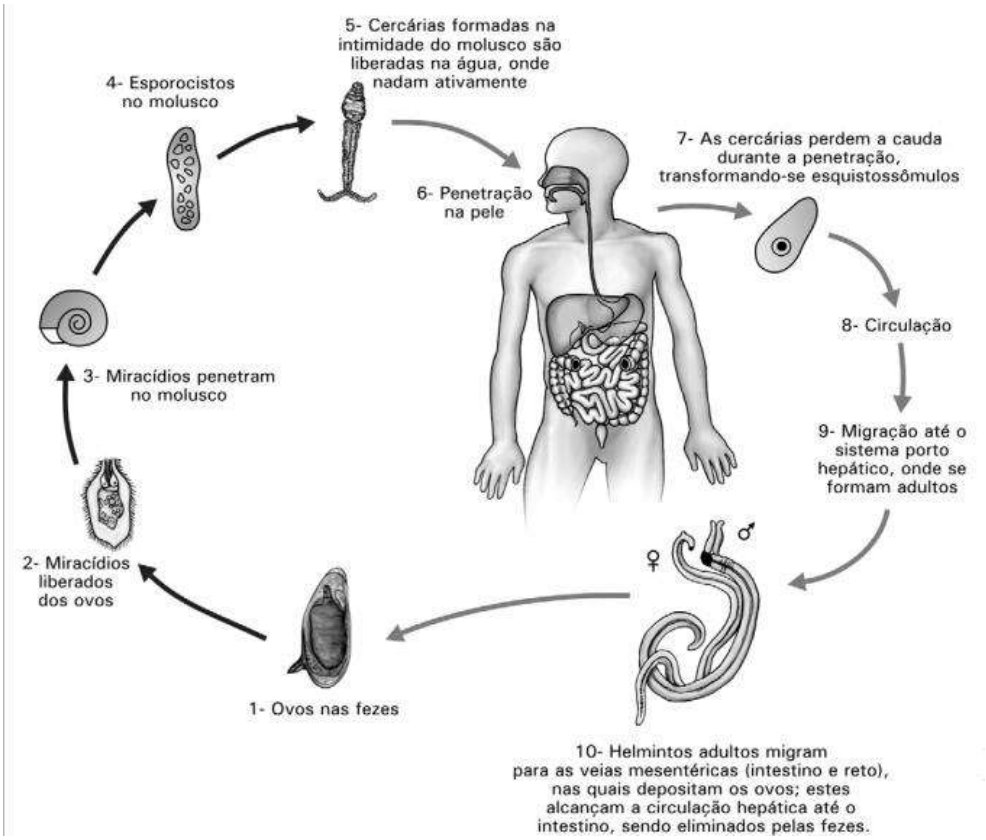
As cercárias (Figura 6D), também chamadas de furcocercárias, devido a sua cauda bifurcada, tem sua estrutura dividida em corpo e cauda com 0,5 cm de comprimento, possuindo uma ventosa oral, com as glândulas de penetração, e outra acetabular na região do corpo (MELO; COELHO, 2016). Essa fase larval possui uma maior capacidade de penetração até 8 a 12 horas após liberação e com o passar do tempo essa capacidade diminui devido ao consumo de suas reservas energéticas (JOLLY et al., 2007)

2.2.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

A fase assexuada do ciclo tem início quando fezes do hospedeiro definitivo, contendo ovos de *S. mansoni* (Figura 7 etapa 1), alcançam coleções de água doce. Em contato com a água, ovos maduros do parasita eclodem devido ao fluxo osmótico de água e luz intensa, oxigenação e temperaturas mais elevadas. A estrutura liberada

de dentro do ovo é o miracídio (Figura 7 etapa 2), larva ciliada que nada ativamente, seguindo mecanismos de foto e quimiotaxia, até infectar moluscos do gênero *Biomphalaria.* A penetração acontece através de substâncias histolíticas secretadas por suas glândulas cefálicas e intensos movimentos miracidianos. A penetração (Figura 7 etapa 3) pode acontecer em qualquer região, mas preferencialmente pela base das antenas ou pela região cefalopodal (COELHO et al., 2008a; NEVES, 2012; REY, 2008, 2011).

Figura 7 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: (SOUZA et al., 2011)

Quarenta e oito horas depois o miracídio passa por alterações morfológicas e se torna esporocisto primário (Figura 7 etapa 4) contendo células germinativas que se multiplicam originando esporocistos secundários. Das células germinativas presentes nesses esporocistos secundários, se desenvolvem as cercárias (Figura 7 etapa 5). As cercárias, em condições ideais de temperatura e luminosidade, nadam até o hospedeiro definitivo (FARO et al., 2013).

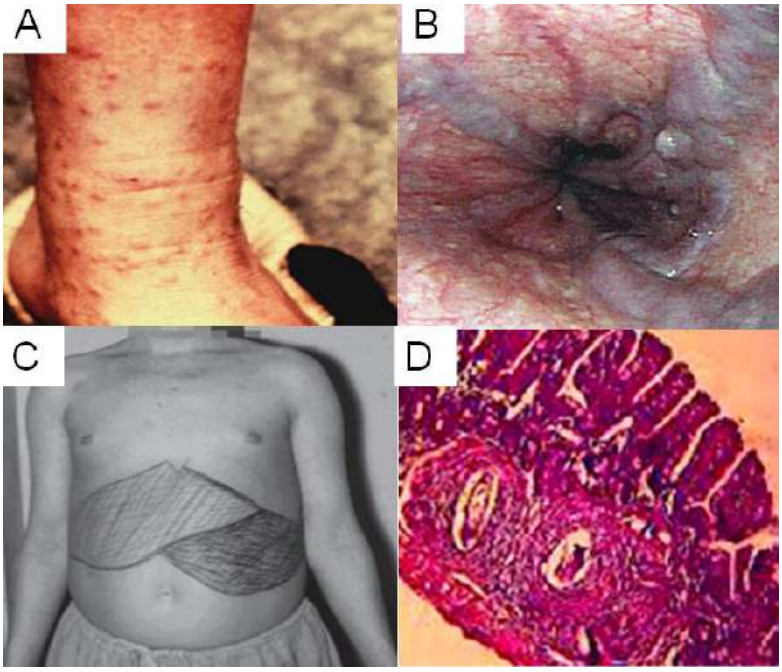
A penetração das cercárias (Figura 7 etapa 6), no indivíduo marca o início da fase sexuada do ciclo. A penetração acontece de forma ativa, com auxílio das ventosas oral e ventral e secreção de enzimas líticas pelas glândulas acetabulares. A perda da cauda bifurcada (Figura 7 etapa 7) acontece através de movimentos vibratórios no momento em que alcançam capilares cutâneos, tornando-se esquistossômulo (Figura 7 etapa 8) (MACHADO-SILVA; NEVES; GOMES, 2008; BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Através da circulação sanguínea e\ou linfática os esquistossômulos chegam à circulação venosa e seguem rumo ao coração e pulmões. O agora esquistossômulo pulmonar retorna ao coração, migra por diversos órgãos e aloja-se no sistema porta intra-hepático (LENZI et al., 2008). Cerca de 30 dias após a infecção ocorre a diferenciação sexual da forma jovem em macho ou fêmea que copulam e permanecem juntos (Figura 7 etapa 9). Posteriormente acontece a migração dos casais para as veias mesentéricas até as vênulas da submucosa intestinal onde ocorre a postura dos ovos (Figura 7 etapa 10). Neste momento o ovo contém um embrião em formação que vai amadurecendo no decorrer de uma semana, tempo que o ovo leva para atravessar o epitélio intestinal e chegar à luz do intestino. Esses ovos são então eliminados junto às fezes e quando alcançam coleções hídricas reiniciam o ciclo do parasita (ROQUIS et al., 2015).

2.2.3 Sintomatologia e patogênese da esquistossomose

A sintomatologia da esquistossomose acompanha a migração e o desenvolvimento do *S. mansoni* no hospedeiro definitivo, embora muitos casos se mantenham assintomáticos. A classificação dessas fases pode variar a depender do autor em questão. É possível classificá-las entre forma aguda e forma crônica. A forma aguda abrange o período inicial da infecção, iniciando cerca de 12 horas após a penetração das cercárias, quando os pontos de penetração desenvolvem reações inflamatórias na derme e subderme da pele, é denominada dermatite cercariana (Figura 8A), que tem intensidade variada a depender do número de cercárias (Lichtenbergova et al., 2008; Mahmoud et al, 2009). Quando o esquistossômulo chega aos pulmões, sua presença pode gerar arterite, arteriolite e necrose, além de um infiltrado leucocitário (PRATA; COURA, 2008; KING; MAHMOUD, 2016).

Figura 8 - Apresentação clínica da esquistossomose



Fontes: A-(LAMBERTUCCI, 2010); B-(KODAMA et al., 2009); C-(PRATA; COURA, 2008); D-(LIMA et al., 2012). A- Dermatite cercariana; B- Varizes esofágicas; C- Hepatoesplenomegalia; D- Granulomas em tecido intestinal.

Denominada febre de Katayama, a fase aguda da esquistossomose pode ser sintomática, assintomática ou confundida com outras doenças da infância (VITORINO et al., 2012; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017). Esta fase é dividida em uma fase pré-patente, antes da oviposição e apresentando sintomatologia variada, e pós-patente, após a oviposição, momento em que nos exames de fezes são visualizados os ovos e já há a presença de grandes granulomas periovulares em órgãos como fígado, intestino e pulmão, bem como infiltrados inflamatórios nestes órgãos (Silva et al., 2008).

As formas crônicas da doença têm início cerca de 6 meses após a infecção e podem durar anos. Nesta fase as manifestações clínicas variam de acordo com o local e o grau de parasitismo, capacidade imunológica do indivíduo e tratamento (VITORINO et al., 2012; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017). Ocorre então inflamação granulomatosa ocasionada pela reação do organismo ao acúmulo de ovos e seus antígenos nos tecidos, principalmente o intestinal e hepático. Com a cronificação o tecido inflamado passa pelo processo de fibrose, que tem como

consequência o aumento da pressão do sistema circulatório local, chamado de hipertensão portal. Deste momento em diante a morbidade da doença pode se agravar com o desenvolvimento de hepatomegalia e esplenomegalia (Figura 8C), varizes esofágicas (Figura 8B), e alterações das vilosidades intestinais (Figura 8D). Essas alterações teciduais são as responsáveis pela mortalidade da doença (ANDRADE, 2008; PRATA; COURA, 2008).

A forma crônica da doença pode se apresentar nas seguintes formas (ANDRADE, 2008):

- Forma leve, onde há eliminação de ovos nas fezes, mas sem sintomatologia forte ou específica, geralmente em indivíduos de áreas endêmicas.
- Formas digestivas intestinais e hepatointestinais, também leves, atingem raramente o intestino sozinho e mais comumente intestino e fígado. Acomete frequentemente crianças e adultos jovens.
- Forma crônica grave, onde ocorre fibrose hepática periportal, lesionando e obstruindo a veia porta intra-hepática, embora mantenha a estrutura do parênquima preservada. Nessa forma pode-se desenvolver também hipertensão portal que tem como consequência a formação de varizes esofágicas e hepatoesplenomegalia.
- Forma hepática avançada, quando o fígado do apresenta megalia embora possua alterações macro e microscópicas típicas, devido a uma provável adaptação do sistema vascular local, evitando o excesso de pressão.
- Forma Hepatoesplênica, com espaçamento portal fibroso sistematizado com formações irregulares ou em forma de placa ou estrelas, embora o parênquima permaneça inalterado.

Formas ectópicas também podem acontecer, com a reação granulomatosa esquistossomótica ocorrendo nos tecidos renal (glomerulopatia esquistossomótica), pulmonar (pneumonia esquistossomótica *com cor pumonale*), nervoso (neuroesquistossomose encefálica e/ou neuroesquistossomose mielorradiculopatica) e trato genital. Todas as formas, usuais ou não, podem cursar com lesões tumorais em consequência do acúmulo massivo e focal de ovos (ANDRADE, 2008; FERRARI; DRUMMOND; REIS, 2008).

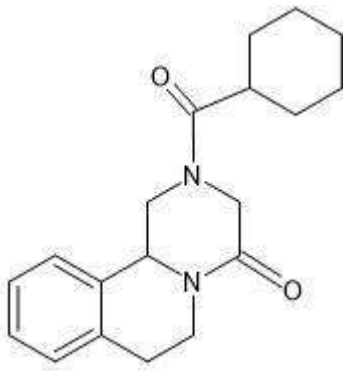
2.2.4 Diagnóstico, Tratamento e Profilaxia da esquistossomose

As manifestações clínicas da esquistossomose auxiliam no diagnóstico durante a anamnese do paciente, junto a dados epidemiológicos da região e histórico de exposição a fatores de risco para infecção. A confirmação laboratorial é realizada através de exame coproparasitológico pelos métodos de sedimentação espontânea Hoffman, Pons e Janer ou Kato-Katz, sendo este último mais específico e com resultado quantitativo para a carga parasitária (BRASIL, 2014).

Métodos imunológicos como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e IFI (Imunofluorescência indireta) também podem ser usados na pesquisa de anticorpos contra o parasita. Outra forma de diagnóstico é pelo uso de exames de imagem como a ultrassonografia, onde se avalia presença e grau de fibrose, além de alterações anatômicas no tecido hepático (VITORINO et al., 2012).

O Praziquantel (PZQ) (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a] isoquinolina-4) (Figura 9) é o fármaco de escolha pela OMS para o tratamento da esquistossomose, se mostrando eficaz para a cura parasitária, com taxas entre 75% e 95%, e redução de 80% a 90% na contagem de ovos dos pacientes não curados (VALE et al., 2017; FARMANGUINHOS, 2018). Na última década, os esforços no tratamento com PZQ mostraram um progresso substancial no controle da morbidade e da mortalidade. O tratamento se mostra essencial para curar os sintomas e prevenir a progressão para severidade e a forma crônica da doença (MOLOO, 2020).

Figura 9- Estrutura química do Praziquantel



Fonte: Do autor (2021).

Mazigo e colaboradores (2012) realizaram estudos na Tanzânia, demonstrando que a administração em massa do PZQ, embora eficiente na cura do paciente, não é

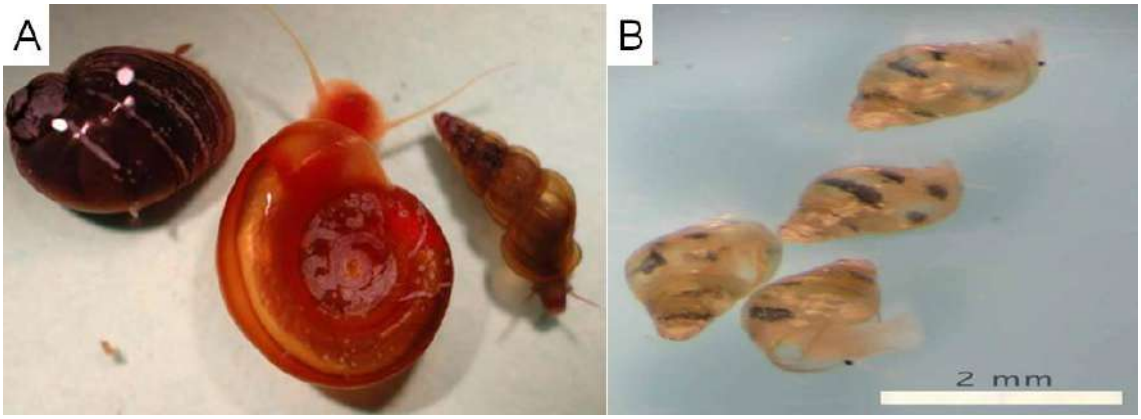
sempre bem sucedida na diminuição da prevalência da esquistossomose, devido a situações onde a cura é incompleta pelo fármaco não atuar sobre fases jovens do verme, reinfecção e o desenvolvimento de resistência (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; CRELLEN et al., 2016). Segundo o Dr. Amadou Garba Djirmay, líder do programa global de controle da esquistossomose da OMS, para alcançar a erradicação da doença é necessário investir em outros métodos de combate como o controle dos moluscos hospedeiros intermediários no ciclo do parasita (MOLOO, 2020). Esse controle pode ser realizado por variados métodos: controle ambiental, controle biológico, controle químico como o emprego de moluscicidas, podendo ajudar a reduzir a transmissão interrompendo o ciclo do parasita (TELES; CARVALHO, 2008; NOYA et al., 2015).

A esquistossomose comumente afeta áreas pobres ou comunidades rurais, especialmente com atividades ligadas a coleções hídricas, como agricultura, pesca e turismo de lazer. Por isso a profilaxia da doença está diretamente relacionada à água e ao cuidado com a população. A OMS preconiza como formas de prevenção e controle das esquistossomoses o tratamento em massa da população, de modo a reduzir o desenvolvimento de casos graves e o surgimento de novos focos de transmissão, o acesso a água potável e saneamento básico para a população, evitando o contato com coleções hídricas possivelmente contaminadas e a contaminação de novos locais, e o controle do hospedeiro intermediário do *S. mansoni* (OMS, 2021).

2.3 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

As diversas espécies de *Schistosoma* não apenas divergem quanto à distribuição geográfica, mas também quanto ao gênero e espécie de seus hospedeiros intermediários. Para o *S. japonicum*, atuam como hospedeiros intermediários caramujos do gênero *Oncomelania* (Figura 10A), o gênero *Bulinus* (Figura 10A) atua para as espécies *S. haematobium, S. intercalatum* e *S. guineensis*, gênero *Neotricula* (Figura 10B) para *S. mekongi* e, por fim, o Gênero *Biomphalaria* (Figura 10A) para o *S. mansoni* (CDC, 2019).

Figura 10 - Hospedeiros de diferentes espécies de *Schistosoma*



Fonte: A- LEWIS (2008); B- https://www.pasteur.la/project-carried-on-in-the-lab-3/investigation-of-northern-migration-of-schistosoma-mekongi-in-lao-peoples-democratic-republic-ongoing/. A- Da esquerda para a direita *Bulinus truncatus truncatus* (*S. haematobium*), *Biomphalaria glabrata* (*S. mansoni*), e *Oncomelania hupensis hupensis (S. japonicum).* B- *Neotricula aperta* (*S. mekongi*).

Acredita-se que, devido à ausência de hospedeiros intermediários compatíveis com o ciclo de outras espécies de *Schistosoma*, não foi possível a adaptação dessas espécies nas Américas (KATZ; ALMEIDA, 2003). O ciclo de desenvolvimento do parasita depende não apenas de características ambientais, como luminosidade e temperatura, mas também do comportamento biológico, compatibilidade fisiológica da susceptibilidade e do sistema imunológico dos hospedeiros intermediários e mecanismos adaptativos do parasita, sem os quais o desenvolvimento não progride (COELHO et al., 2008b). A dependência do êxito do parasita com a disponibilidade desses caramujos também é evidenciada pela correlação com o processo de diapausa destes. Foi demonstrado que esporocistos primários são capazes de reduzir seu metabolismo em consonância com o metabolismo de *B. glabrata* quando expostos a situações adversas, retornando à atividade metabólica e continuando seu desenvolvimento assim que o caramujo voltar a ter contato com a água e acelerar seu metabolismo, destacando a adaptação do parasita ao comportamento do hospedeiro intermediário. Pesquisadores teorizam a possibilidade de que os surtos sazonais de casos de esquistossomose no litoral Pernambucano são devido a este comportamento (COELHO et al., 2008b; PIERI; FAVRE, 2008).

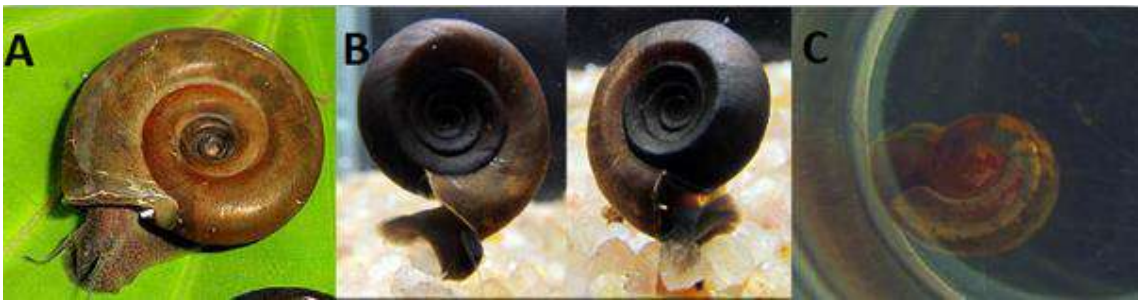
2.3.1 O gênero *Biomphalaria*

Os caramujos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no território brasileiro, são assim classificados taxonomicamente (LIMA, 1995):

Reino: Animalia,
Filo: Mollusca,
Classe: Gastropoda,
Subclasse: Pulmonata,
Ordem: Basommatophora,
Família: Planorbidae
Gênero *Biomphalaria*.

Com relação às espécies consideradas de interesse no Brasil, por passarem pelo processo de infecção natural, são *B. glabrata* (Say, 1818) (Figura 11A), *B. tenagophila* (D'orbigny, 1835) (Figura 11B) e *B. straminea* (Dunker, 1814) (Figura 11C).

Figura 11 - Espécies de *Biomphalaria spp*.



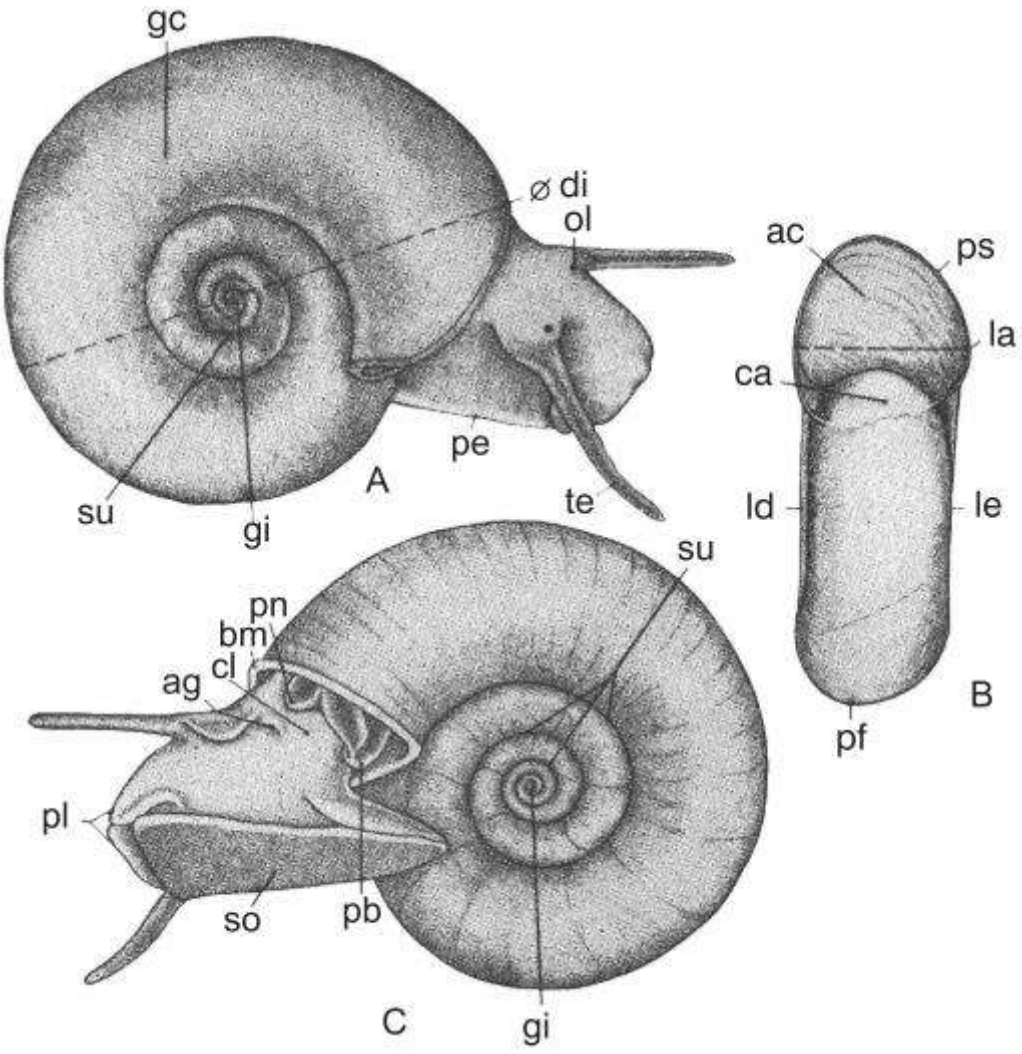
Fonte:A-http://www.xenophora.org/Iconographie/Planorbidae/Biomphalaria%20glabrata%2013/Biomphalaria%20glabrata%2013.html B-http://www.planetainvertebrados.com.br. C-(ZENG et al., 2017) Acesso em: 21/01/2021. A-*Biomphalaria glabrata* B-*Biomphalaria tenagophila* C-*Biomphalaria straminea.*

Outras espécies de *Biomphalaria* foram descritas em território brasileiro. *B. occidentalis* (Paraense 1981) e *B. guaiabensis* (Paraense 1984), semelhantes ao *B. tenagophila,* mais resistentes à infecção por *S. mansoni.* Também existem as espécies *B. amazônica (*Paraense, 1966)*, B. cousini* (Paraense, 1966) e *B. peregrina* (D'orbigny, 1835), que demonstraram susceptibilidade a infecção com miracídeos

originados de regiões endêmicas quando em laboratório, mas sem detecção de infecção natural. Assim como o *B. amazônica,* outras espécies foram posteriormente infectadas laboratorialmente sendo consideradas potenciais hospedeiras (PARAENSE, 1986; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2014; NOYA et al., 2015).

O gênero *Biomphalaria* foi nomeado devido a morfologia do giro central, formando um “umbigo” (omphalos) dos dois lados da concha (Figura 12). Sendo as características anatômicas das espécies de importância médica descritas a seguir: Quando adulto, a concha dos caramujos tem formato de disco bicôncavo, com a concha enrolada em um mesmo plano horizontal, sem opérculo, com curvatura voltada a esquerda (sinistrógira) e de cor geralmente castanha (PARAENSE, 2008).

Figura 12 - Morfologia externa de caramujos do gênero de *Biomphalaria*



Fonte: (PARAENSE, 2008). ac – abertura da concha; ag – abertura genital masculina; bm – borda do manto; ca – calo; cl – colo; gi – giro interno ou apical (primeiro giro); la – largura da

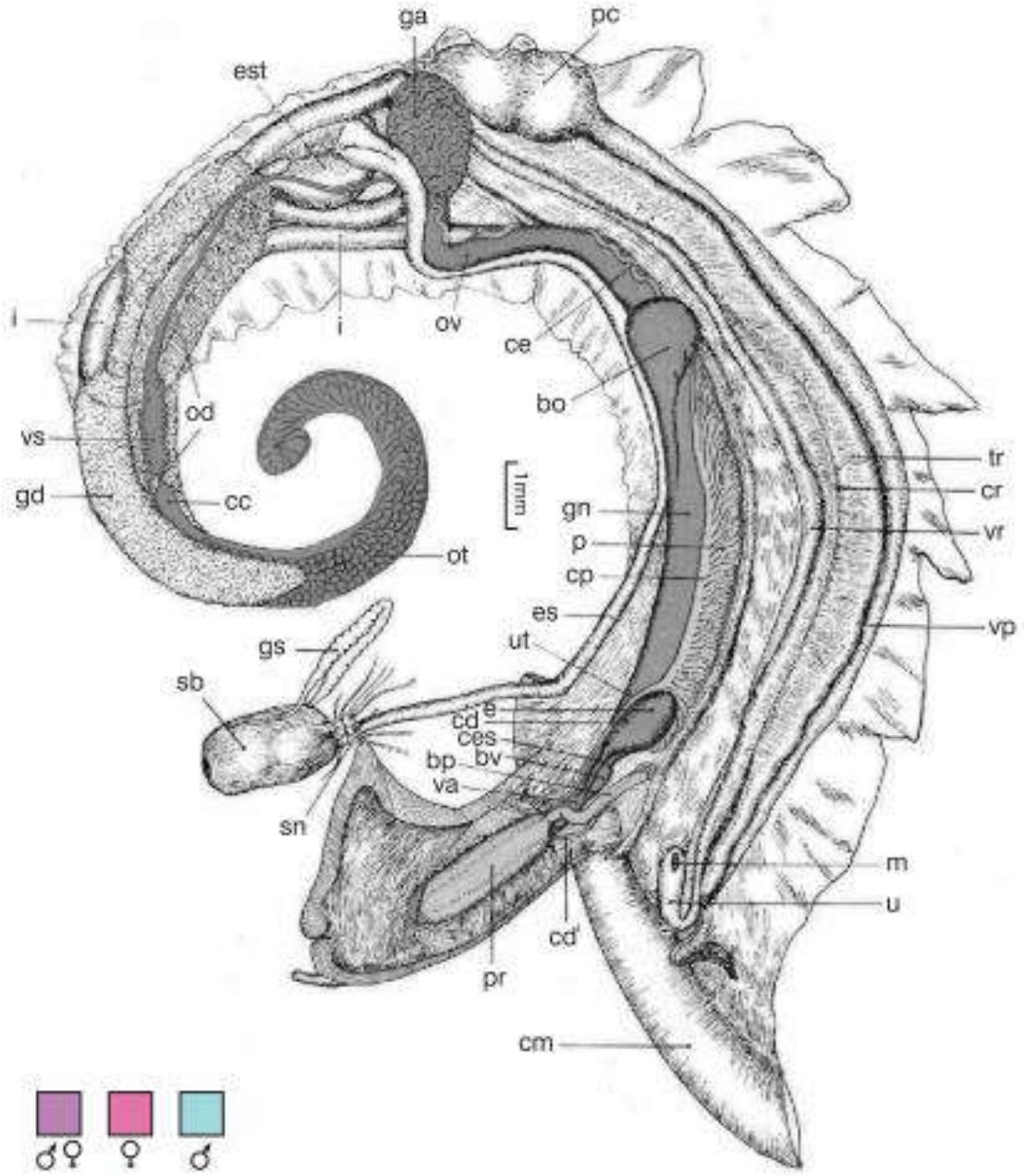
abertura; ld – lado direito; le – lado esquerdo; ol – olho; pb – pseudobrânquia; pc – pericárdio; pe – pé; pf – periferia; pl – palpos labiais; pn – pneumóstoma; pr – prepúcio; ps – perístoma; so – sola; su – sutura; e te – tentáculo.

A concha do *Biomphalaria* e dos gastrópodes em geral é constituída por diversas camadas de material orgânico e calcário, por isso é importante haver presença de cálcio no ambiente e pH ideal para incorporação desse elemento. Cristais de carbonato de cálcio, em forma de aragonita ou calcita, formam as camadas mais internas, enquanto a camada mais externa, chamada perióstraco, é orgânica constituída exclusivamente de material proteico associado a quinonas, chamada cochiolina responsável pela coloração da concha (BARBOSA, 1995; BARNES, R. D.; RUPPERT, 1996).

Na parte posterior da região cefálica há um par de tentáculos flexíveis, filiformes, extensos e cilíndricos, responsáveis pelo tato do caramujo. Os olhos ficam na base dessas projeções com os palpos labiais mais a baixo, próximos a sola. Seu sistema digestivo é constituído por boca, cavidade bucal, mandíbula, ligada a rádula no interior da boca, o esôfago, estômago, intestino, reto e ânus (PARAENSE, 2008). A rádula é revestida por vários dentículos quitinosos em forma de gancho responsável por triturar os alimentos (CANTINHA, 2008; REY, 2008).

Os gastrópodes possuem como órgãos sensoriais os olhos, osfrádios (órgão quimiossensor) e rinóforos (quimiorecptores), os tentáculos (receptores de contato) e otocistos (responsáveis pelo equilíbrio e orientação). O sistema nervoso central (Figura 13-sn) é formado por pares de gânglios, um anel nervoso esofágico e dois pares de cordões nervosos longitudinais, possuindo também neurônios sensoriais e motores (BARBOSA, 1995; CIMERMAN; CIMERMAN, 2005; PARAENSE, 2008; REY, 2008). No sistema respiratório, o principal órgão é o saco pulmonar que se abre na cavidade paleal através das pneumóstomas e, junto as pseudobrânquias, realiza a respiração nos caramujos (CIMERMAN; CIMERMAN, 2005; CANTINHA, 2008; NEVES, 2012).

Figura 13 - Estruturas de importância anatômica do *B. glabrata.*



Fonte: (PARAENSE, 2008). bo – bolsa do oviduto; bp – bainha do pênis; bv – bolsa vaginal; cc – canal coletor do ovoteste; cd, cd' – canal deferente; ce – canal espermático; ces – canal da espermateca; cm – colar do manto; cp – canal prostático; cr – crista renal; e – espermateca; es – esôfago; est – estômago; ga – glândula do albume; gd – glândula digestiva (hepatopâncreas); gn – glândula nidamental; i – intestino; m – meato do ureter; od – ovispermiduto; ot – ovoteste; p – próstata; pc – pericárdio; pr – prepúcio; sb – saco bucal; sn – sistema nervoso central; tr – tubo renal; u – ureter; ut – útero; va – vagina; vp – veia pulmonar; vr – veia renal; vs – vesícula seminal;

Como outros caramujos gastrópodes, *B. glabrata* apresenta um sistema circulatório aberto onde os hemócitos presentes na hemolinfa atuam como células efetoras de seu sistema imune, sendo divididos em granulócitos (80%) ou hialinócitos (20%) responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas e possíveis organismos invasores, lembrando os macrófagos presentes em animais vertebrados (BARBOSA, 1995; PARAENSE, 2008; CAVALCANTI, 2011; NEVES, 2012). Outras funções realizadas por hemócitos são encapsular invasores como parasitas, transporte de cálcio no reparo tecidual, liberação de substâncias tóxicas e produção de fatores solúveis que são capazes de estimular outros hemócitos e a coagulação (JONG-BRINK; BAGGEN, 1992; PARAENSE, 2008; CAVALCANTI, 2011). A hemolinfa é composta por plasma rico em água, hemoglobina, ferro dissolvido, que representa 97% das proteínas presentes, bicarbonatos, cloreto de sódio, proteínas e os próprios hemócitos (VERRENGIA GUERRERO et al., 1997; REY, 2008; CAVALCANTI, 2011; PESSÔA, S. B.; MARTINS, 2011).

A literatura ainda traz discordâncias quanto a origem dessas células sanguíneas. Enquanto não há evidencias de um único órgão hematopoiético especializado, há diversas indicações quanto a produção dessas células por áreas diversas do corpo dos caramujos (PARAENSE, 2008). Alguns autores consideram que são originadas de células conjuntivas de diversas partes enquanto outros especulam serem produzidos principalmente por um órgão intitulado Amebocyte Producing Organ (APO), localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto (SOUZA, 2006; PARAENSE, 2008; SALAMAT; SULLIVAN, 2009). Os hemócitos estão presentes livremente na circulação sanguínea ou fixos nos tecidos. O coração presente nesse sistema é recoberto por membrana pericárdica e dividido em uma aurícula e um ventrículo, sendo responsável por bombear a hemolinfa partindo da artéria aorta e irrigando os tecidos para depois ser drenado nos seios venosos e retornar através das veias pulmonar e renal, sendo reoxigenada no processo (SOUZA, 2006; PARAENSE, 2008; PESSÔA, S. B.; MARTINS, 2011).

As características do sistema reprodutor destes caramujos são alguns dos responsáveis por identificar os planorbídeos. Seguindo a tendência de sua subclasse, *Biomphalaria* agrupa caramujos hermafroditas, com o ovotéstis produzindo ambas as células germinais lado a lado, tanto espermatozoides quanto óvulos, embora em momentos diferentes (PARAENSE, 2008). O ovotéstis, localizado na extremidade

caudal do corpo é constituído de vesículas simples em forma de pêra, bi, tri ou quadrifurcadas, com vários folículos cada um produzindo gametas (BARBOSA, 1995; CANTINHA, 2008; PARAENSE, 2008). Embora sejam capazes de realizar autofecundação, quando em colônias e em situações favoráveis, esses caramujos preferem realizar fecundação cruzada, garantindo maior variabilidade genética (BARBOSA, 1995; CANTINHA, 2008; PARAENSE, 2008; NEVES, 2012;). Por outro lado, uma característica que dificulta a eliminação do molusco em focos de transmissão, é que quando em situações adversas os poucos indivíduos que sobreviveram são capazes de restaurar a população em questão de meses (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2014; PALASIO et al., 2015). Ainda, Costa e colaboradores (2004) avaliaram que o *B. glabrata* possui maior capacidade reprodutiva quando em fertilização cruzada do que em autofecundação.

Caramujos *Biomphalaria* tem como habitat, coleções hídricas dulcícolas naturais, artificiais ou temporárias, independente da altitude, de tipo lêntico ou lótico, embora sejam mais comuns nas margens de rios de pequeno porte de correnteza fraca. Um corpo d'água rico em matéria orgânica, de pH neutro e temperaturas na faixa de 20 a 26°C com baixa velocidade de fluxo é o ideal para o desenvolvimento dessa espécie de caramujo, embora tenham sido documentados diversos criadouros em lavouras, locais poluídos e esgotos. Mesmo que sua movimentação ativa seja lenta, a espécie pode se dispersar de forma bastante eficaz através de flutuação ou agregado a outros dejetos arrastados pelo fluxo d'água. A colonização de novos locais pode ser também bem sucedida por transporte passivo, tanto das desovas como de indivíduos em estágio de dormência (TELES; CARVALHO, 2008). Esses moluscos podem se alimentar de limo, frutas, algas ou folhas, de modo que a presença de vegetação natural ao redor ou flutuante no lago é muito vantajosa, pois serve como substrato para o caramujo, tanto para alimentação quanto para abrigo e suporte (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2014).

Biomphalaria glabrata é usado como modelo de estudo devido a sua grande distribuição geográfica, longo ciclo de vida e fácil manutenção em laboratório (HOTEZ et al., 2009; SCHOLTE et al., 2014). Em seu habitat pode haver um percentual de até 70% de infectados, enquanto em condições laboratoriais a taxa chega a 100%, sendo o espécime mais susceptível, e, portanto, ideal para manter o parasita. Mudanças comportamentais, reprodutivas e fisiológicas podem acontecer no *B. glabrata* em

infecções parasitárias, inanição, estivação (dormência por condições adversas) e exposição a moluscicidas (WHITE; FRIED; SHERMA, 2007; MELLO-SILVA et al., 2011; FARO et al., 2013).

Para um moluscicida ser realmente efetivo, é necessário que também seja capaz de matar os embriões dos caramujos, evitando que os sobreviventes voltem a repovoar a região muito rapidamente. De modo que, para a devida compreensão de possíveis efeitos teratogênicos ocasionados por novos agentes, é necessária uma adequada compreensão do desenvolvimento embrionário normal dos caramujos (WATANABE, 2008).

2.3.2 Características embrionárias

O potencial reprodutivo do *Biomphalaria glabrata* pode sofrer alterações devido a infecções parasitárias, inanição e exposição a agentes tóxicos por afetar suas reservas de carboidratos, alterações na glicose hemolinfática, níveis de glicogênio e mobilização das reservas de galactógenos, tornando-os bons indicadores para condições adversas como exposição a poluentes aquáticos (MELLO-SILVA et al., 2007; FARO et al., 2013; AUGUSTO et al., 2015).

Diversos autores estudaram a embriologia do *Biomphalaria sp*., descrevendo um total de 4 estádios embrionários, sendo eles blástula, gástrula, trocófora e véliger (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RE, 1992; KAWANO et al., 2004; WATANABE, 2008). No entanto, antes de alcançar estes estádios alguns processos são necessários. O início se dá com a oviposição. Esses caramujos tendem a depositar suas desovas em superfície próximas a água como pedras nas margens de rios ou folhas e galhos flutuantes. Cada uma dessas desovas, quando em condições ideais podem chegar a conter mais de 100 ovos. Esses ovos, quando maduros medem cerca de 100 µm de diâmetro. Quando no ambiente, esses ovos passam por uma série de clivagens mitóticas até atingir o primeiro estádio (WATANABE, 2008).

Em aproximadamente 15 horas após a primeira clivagem, o embrião se encontra no estádio de blástula (Figura 14A), onde passa por mitoses, mas sem aumentar o volume celular. O estádio de gástrula (Figura 14B), fase seguinte, ocorre entre 24 e 39 horas após a 1° clivagem e nele acontecem um achatamento na região do polo vegetativo seguindo para o polo animal, apresenta três camadas celulares,

ectoderme, mesoderme e endoderme, fim das clivagens, e início de movimentação celular, crescimento e diferenciação. O estádio de trocófora (Figura 14C) acontece entre 40 e 90 horas após a 1° clivagem. Aqui acontece a organogênese e formação das regiões que separam as partes pré-trocal, posteriormente torna-se a região cefálica, e pós-trocal, que dará origem a boca. Na região oposta encontra-se a glândula da concha. De 96 a 120 horas após a 1° clivagem, temos o estádio de véliger (Figura 14D), com alta movimentação dentro do ovo e caramujo jovem quase totalmente formado. Após as 120 horas, se tem a fase *hippo stage* (Figura 14E), com a formação da concha sobre parte do corpo e do pé, o aparecimento dos tentáculos e olhos. Por fim, cerca de 6 dias após a 1° clivagem ocorre a eclosão das desovas (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RE, 1992; KAWANO et al., 2004; WATANABE, 2008).

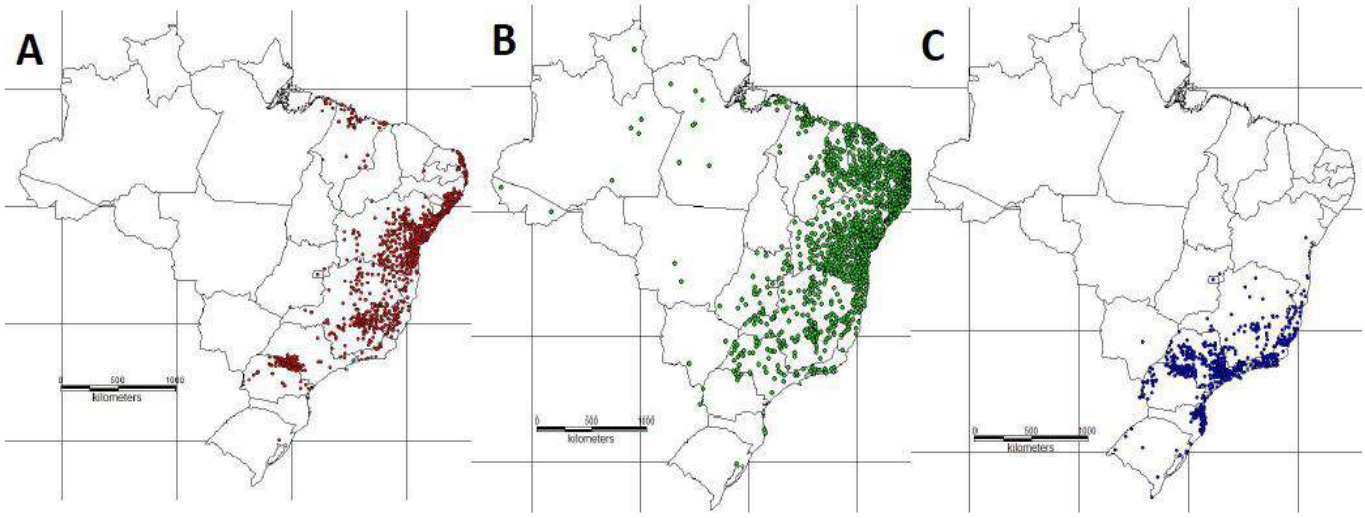
Figura 14 - Diferentes estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*:

Fonte: (ARAÚJO et al., 2021). A- blástula, B- gástrula, C- trocófora, D- véliger e E- *Hippo stage.*

2.3.3 Distribuição geográfica

Biomphalaria glabrata (Figura 15A) é considerado o mais importante hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* no Brasil devido à alta susceptibilidade ao parasita e sua distribuição nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país, onde sua presença é quase sempre associada a presença de casos da parasitose (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2014).

Figura 15 - Distribuição dos hospedeiros intermediários no Brasil.



Fonte: (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2014). A-*Biomphalaria glabrata.* B- *Biomphalaria straminea.* C- *Biomphalaria tenagophila.*

Biomphalaria. straminea (Figura 15B) é a segunda espécie em importância como hospedeiro, sendo considerado um mau vetor do ponto de vista biológico, pois apresenta certa resistência a infecção pelo parasita, rápida mortalidade após infecção em laboratório e refratariedade na liberação de cercarias quando infectado, características atribuídas ao seu sistema imunológico e ativação de genes de resistência. Embora seja a espécie mais adaptável a todos os climas do país possuindo também a maior distribuição territorial. *Biomphalaria tenagophila* (Figura 15C) possui a menor distribuição estando presente em apenas 10 estado, mais restrita às regiões Sul e Sudeste (PARAENSE, 1986; CAVALCANTI et al., 2012; NOYA et al., 2015).

Em 2008, o ministério da saúde atualizou os dados de distribuição geográfica dos moluscos hospedeiros do *S. mansoni* nos estados com o intuito de reforçar o

Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2014). Essa distribuição foi reafirmada por Carvalho e colaboradores (2018).

2.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE

As estratégias de combate a esquistossomose costumavam ser baseadas na administração de agentes químicos como moluscicidas. Nos anos 70, o combate a esquistossomose foi fortemente direcionado a aplicação de moluscicidas devido à dificuldade de tratamento, baixa eficácia e os efeitos colaterais das drogas disponíveis. Com o alto custo e baixa eficácia das substâncias utilizadas, ocorreu um aumento na busca por alternativas moluscicidas naturais (TELES; CARVALHO, 2008). A partir de 1984 foi introduzida a estratégia de quimioterapia seletiva, ou em massa em locais endêmicos, com praziquantel e oxamniquine. Desde 2006, a estratégia mudou do tratamento em massa da população para o tratamento preventivo com PZQ (NOYA et al., 2015)

Em 2017, a OMS instaurou a resolução WHA70.16 que estabelece a redução em ao menos 40% na incidência de vetores de doenças transmissíveis até 2025. Como problema de saúde pública de grande importância o controle dos caramujos envolvidos na esquistossomose tem sido reforçado pela organização, no intuito de eliminar a parasitose, corroborando com as campanhas de tratamento em massa da população (MOLOO, 2020).

Para facilitar a implementação do controle vetorial, manuais foram publicados a respeito da utilização de moluscicidas e, procedimentos e critérios para teste da eficácia dessas substâncias pela OMS em 2017 e em 2019 (OMS, 2017, 2019). A niclosamida foi a escolha de tratamento malacológico no passado, como ocorreu na China durante 30 anos. No entanto, as outras partes do mundo seguiram a via contraria e os programas de controle foram gradualmente descontinuados e sua competência foi enfraquecida (MOLOO, 2020).

Segundo o Dr. Rajpal Yadav, cientista do Departamento de Controle de DTN da OMS:

> *“O controle malacológico é um componente crucial da estratégia global de eliminação da esquistossomose. É tempo de procurar por novos produtos para controle de caramujos que possuam custo-benefício e baixo risco aos seres humanos e ao meio ambiente. Alguns esforços estão sendo realizados para explorar compostos*

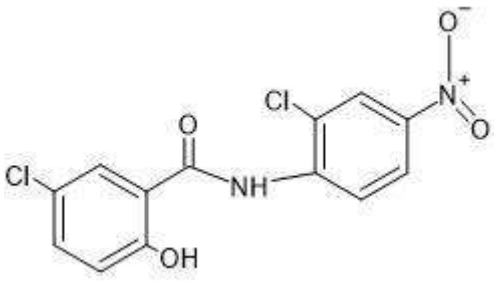
> *moluscicidas a partir de plantas, algas marinhas e microrganismos" (MOLOO, 2020, tradução nossa).*

Uma terceira opção para o controle da esquistossomose, além de tratamento em massa com o praziquantel e o combate ao caramujo vetor, é a o aumento da cobertura do saneamento básico em áreas de habitação humanas, assim como a disponibilização de água potável para a população. A presença de saneamento básico e a implementação de ações de educação sanitária para a população podem diminuir o contato de fezes contaminadas com as coleções hídricas, impedindo a instalação de novos focos de transmissão da doença (OMS, 2021).

2.4.1 Controle populacional do *Biomphalaria glabrata*

A niclosamida (2,5'-dicloro-4'- aminosalicilanilida) (Figura 16) é a droga de escolha da OMS como agente moluscicida, trata-se de um pó solúvel amarelo que pode ser aplicado por gotejamento ou aspersão a depender do volume do corpo hídrico tratado (TELES; CARVALHO, 2008; OMS, 2017). A niclosamida atua inibindo a fosforilação oxidativa, interrompendo a respiração mitocondrial quando em concentração superior a 0,1 nM em caramujos (HOLLINGWORTH, 2001). Além de sua ação moluscicida, a niclosamida também apresenta ação contra helmintos cestoides e está presente em formulações para o tratamento de teníase (ANDREWS; THYSSEN; LORKE, 1982).

Figura 16 - Estrutura química da niclosamida.



Fonte: Do autor (2021).

Ainda que eficaz na mortalidade de miracídios e cercárias e na redução da população de caramujos com elevada toxicidade e causando mortalidade de 100% em 8 horas na concentração de 1 mg/L, a niclosamida também demonstrou ação inespecífica atingindo a fauna e flora local, especialmente peixes e anfíbios (VEGA et

al., 1988; TELES; CARVALHO, 2008). Com elevado custo de produção, sendo tóxico para a pele e mucosa de seres humanos e a instabilidade a luz solar, o fármaco possui uma razão custo benefício questionável (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; ABREU; GOULART; OLIVEIRA BRETT, 2002; RAPADO, 2012).

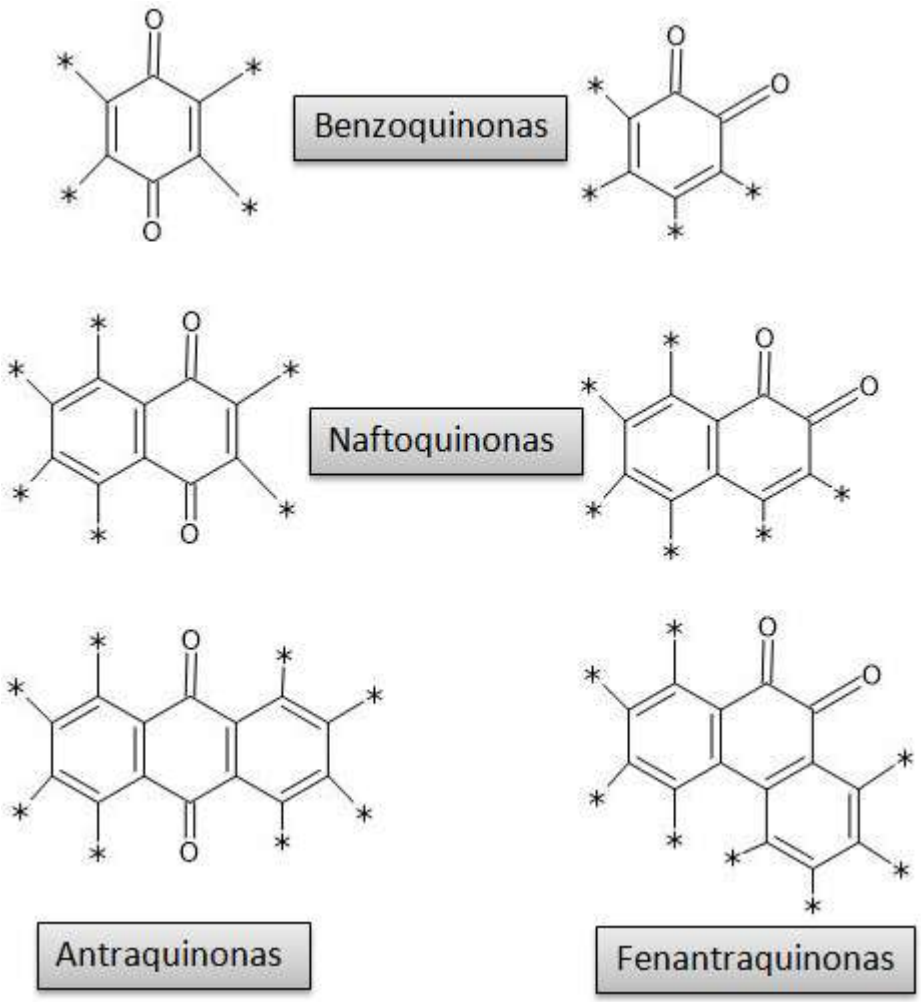
Outro aspecto negativo quanto a niclosamida, é a incapacidade de interromper, de forma definitiva, a transmissão local devido a presença de sobreviventes que voltam a reproduzir, a eclosão de desovas sobreviventes ou a chegada de novos indivíduos por dispersão de outros locais (TELES; CARVALHO, 2008).

2.5 QUINONAS DE ORIGEM NATURAL

Nas últimas décadas, a comunidade científica voltou seu interesse a pesquisa de novas drogas baseadas em substâncias bioativas produzidas por plantas (HAKURA et al., 1994; SIMONSEN et al., 2001; LU et al., 2013; EL-BESHBISHI et al., 2015; ALFEROVA et al., 2019). Essa necessidade de novos fármacos, principalmente de origem natural, se instalou devido ao desenvolvimento de variados mecanismos de resistência aos tratamentos já empregados para os mais diversos organismos, desde bactérias multirresistentes à parasitas que desenvolveram mecanismos de escape para os fármacos disponíveis no mercado.

Metabólitos secundários produzidos a partir das raízes, folhas, flores e demais estruturas de plantas diversas tem demonstrado as mais variadas propriedades farmacológicas (DER VIJVER, 1972; LÓPEZ L.; LEYVA; GARCIA DE LA CRUZ, 2006; TRIPATHI; PANDA; BISWAL, 2019; ROY, 2020). Quimicamente, quinonas são substâncias orgânicas classificadas como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO), com duas carboxilas em posições orto ou para, ligadas a um anel insaturado de seis átomos de carbono (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016). Na natureza, as quinonas são produzidas como metabólitos secundários de plantas, possuindo diversas atividades biológicas como ação anticancerígena, antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória. Essas substâncias podem ser classificadas, de acordo com os anéis de 6 átomos de carbono presentes em sua estrutura em antraquinonas, benzoquinonas, fenantraquinonas e, por fim, naftoquinonas (LU et al., 2013) (Figura 17).

Figura 17- Estrutura química das classes de quinonas naturais.



Fonte: Do autor (2021).

As naftoquinonas possuem um anel aromático naftaleno, como indicado por seu nome. São substâncias que compõem uma classe de derivados naftalenos orgânicos, incluindo compostos de origem sintética ou natural, presentes em diversas espécies vegetais (HOOK, 2001; FOWLER et al., 2018). Muito utilizadas na medicina tradicional asiática para o tratamento de diversas doenças, desde inflamação a parasitoses, plantas contendo naftoquinonas demonstram ter fortes efeitos citotóxicos, com ação inseticida, antibacteriana e antifúngica (BABULA et al., 2007; ALFEROVA et al., 2019). Essa toxicidade é creditada a dois mecanismos potenciais, alquilação de proteínas/DNA ou pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando estresse oxidativo (HAKURA et al., 1994; SHANG et al., 2012; TSAO et al., 2020).

As naftoquinonas são reduzidas enzimaticamente gerando espécies reativas de oxigênio (EROS) (SHANG et al., 2012; TSAO et al., 2020). Esse processo de redução da molécula pode ter resultados distintos a depender de quantos elétrons são reduzidos. Se for apenas um elétron ocorre a produção de semiquinonas através da ação de ubiquinona oxidoredutase, citocromo b5 redutase, NADPH-citocromo P450 redutase e xantina oxidoredutase. Como consequência as naftoquinonas são capazes de parar o ciclo celular, causar danos ao DNA, induzir a apoptose, interromper a atividade de telômeros, da telomerase, inibir outros componentes do ciclo celular, aumentar a produção de ROS, alterar a expressão de marcadores celulares, inibir vias de sinalização, suprimir a expressão de vias de angiogênese e vacuolização citoplasmática induzida (Yin et al., 2020; TSAO et al., 2020).

Bhuwan e colaboradores (2012) demonstraram o efeito antiparasitário de uma naftoquinona extraída da *Plumbago zeylanica*, que se mostrou eficaz contra ambas as formas promastigota e amastigota de *Leishmania donovani*. Outras naftoquinonas extraídas das raízes da mesma espécie foram avaliadas quanto a inibição da proliferação celular por Ito e colaboradores (2018), das quais plumzeilanona demonstrou uma supressão parcial da proliferação celular, enquanto maritinona apresentou forte inibição da proliferação celular em todas as linhagens testadas. Outros compostos extraídos das raízes desta espécie mostraram ação antioxidante como demonstrado por Nile e Park (2014).

Quanto a uma possível ação moluscicida, estudos anteriores com diversas naftoquinonas demonstraram considerável eficácia contra gêneros que agem como hospedeiros intermediários da esquistossomose, como *Biomphalaria* e *Bulinus*. Uma pesquisa realizada por Camara e colaboradores (2008) comprovou a ação da Lausona (2-hidroxi-[1,4]naftoquinona) e seus derivados sobre caramujos *Biomphalaria glabrata*, das quais 9 demonstraram potencial moluscicida, destacando que derivados com constituintes apolares apresentam maior ação.

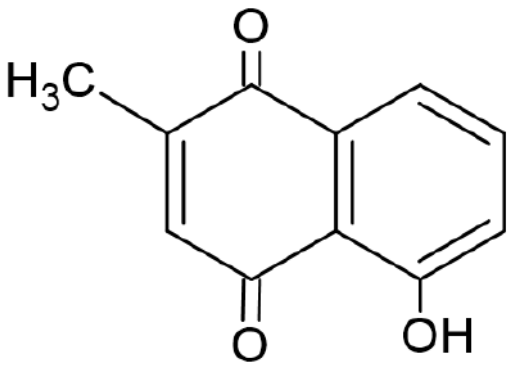
Estudos anteriores demonstraram a eficácia da combinação de fosfato naftoquinona com artemisina, indicado pela OMS para tratamento de todas as formas de malária, como agente moluscicida contra caramujos *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus*, vetores do *S. mansoni* e *S. haematobium*, respectivamente (EL-BESHBISHI et al., 2015, 2019).

A *Plumbago zeylanica,* principalmente suas raízes, é uma conhecida planta medicinal nativa da Ásia e da África, com efeitos conhecidos no tratamento de dores reumáticas, dismenorreia, carbúnculo, contusões, úlceras e eliminação de parasitas (CHETTY et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Sua importância se dá devido a capacidade de produzir naftoquinonas, dentre as quais temos a plumbagina.

2.5.1 Plumbagina

A Plumbagina (figura 18) é uma naftoquinona encontrada nas diversas espécies do gênero *Plumbago*, principalmente em suas raízes, possuindo variadas ações bioativas (DER VIJVER, 1972). Dentre suas atividades biológicas, podem ser citadas as ações anti-inflamatória, anticancerígena, antiparasitária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, analgésica e antifúngica nos mais diversos modelos de infecção (LU et al., 2013).

Figura 18- Estrutura química da Plumbagina.



Fonte: Do autor (2022).

Diversos estudos foram desenvolvidos sobre a influência da plumbagina sobre diversas doenças inflamatórias e relacionadas. Em artigo publicado por Wang e colaboradores (2018), foi demonstrado a ação anti-inflamatória e imunossupressora da plumbagina presente na *Plumbago zeylanica L*., através de sua ação inibindo o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno, além de suprimir a inflamação local e sistêmica. O mecanismo sugerido aqui foi o de inibição da via NF-kB e fosforilação de MAP quinase.

As atividades hipolipemiante e hepatoprotetora da plumbagina, intrinsecamente relacionadas com sua ação anti-inflamatória, antioxidante e antifibrótica, também

foram avaliadas no tratamento de obesidade e esteatose não alcoólica induzida por frutose. Neste caso o mecanismo retratado foi a redução da expressão gênica de SREBP-1c e aumento de PPAR-α (PAI et al., 2019).

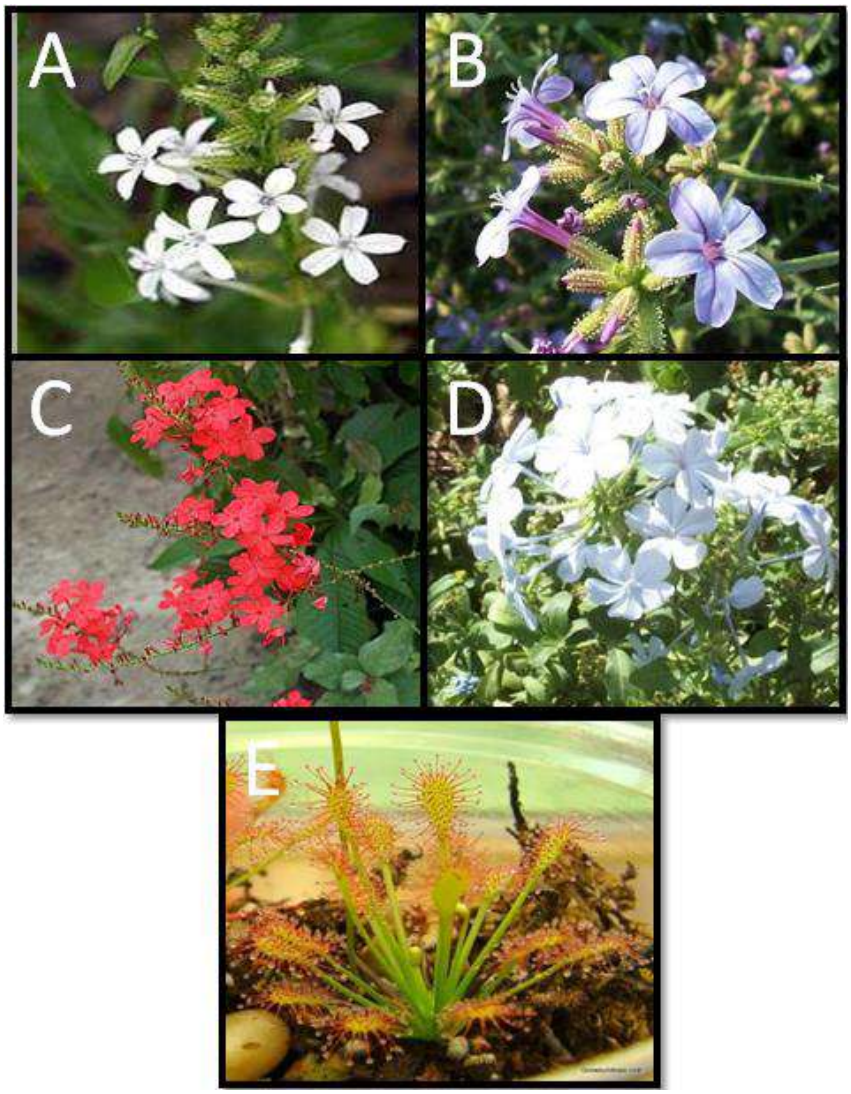
A Isoplumbagina (5-hidroxi-3-metil-1,4-naftoquinona), extraída da *Plumbago europaea*, demonstrou atividade anticâncer através da modulação da função e dinâmica mitocondrial como demonstrado por Tsao e colaboradores (2020). A plumbagina parece ser capaz de inativar as vias Akt/NF-Kb, MMP-9 e VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), todas as 3 desenvolvendo papeis importantes no processo carcinogênico em diversos tipos celulares (ROY, 2020). No entanto, os mecanismos envolvidos em sua capacidade anticancerígena parecem ser variados, incluindo ação antiangiogênica, antimetastáticas, evitando a invasão de tecidos, parada do ciclo celular e estimulação da apoptose e vias autofágicas. Esses efeitos advêm da regulação genética, capacidade de produção de EROs, danos ao DNA e supressão da glutationa celular. Outra ação interessante, além da ação direta sobre o tumor, é a capacidade de ressensibilizar células cancerígenas que tenham desenvolvido resistência a quimio e/ou radioterapia (TRIPATHI; PANDA; BISWAL, 2019).

A atividade antiviral da plumbagina foi demonstrada por ensaios *in vitro* sobre o vírus da hepatite C (HCV), quando comparado a ação do telaprevir (HASSAN; BERCHOVÁ-BÍMOVÁ; PETRÁŠ, 2016). A plumbagina extraída das raízes de *Plumbago scandens* possui um potencial microbiostático observado em experimentos realizados com *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* embora não tenha apresentado efeito sobre as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (DE PAIVA et al., 2003). A plumbagina isolada da *P. indica* teve efeito comprovado contra *Mycobacterium tuberculosis*, ao agir sobre a enzima ThyX, responsável pela síntese de Dtmp, sendo capaz induzir a morte celular (SARKAR et al., 2020).

Quanto a ação contra fungos, a plumbagina isolada de *Drosera intermedia* demonstrou ser capaz de inibir o crescimento fúngico tanto de leveduras quanto de fungos filamentosos relacionados a deterioração de alimentos, com ação semelhante à de alguns antifúngicos (GREVENSTUK et al., 2012) A plumbagina da *P. indica* se mostrou eficaz contra isolados clínicos de *Candida albicans*, com efeito aditivo quando associado a anfotericina B, como demonstrado por Hassan e colaboradores (2016).

Uma possível ação antiparasitária foi avaliada, como potencial agente antimalárico, demonstrando efeito *in vitro*, quando utilizado o extrato etanólico de *Plumbago zeylanica* (SIMONSEN et al., 2001). Em outro estudo, o extrato etanólico de *Plumbago indica* também foi avaliado e seu efeito *in vitro* comprovado contra o *Plasmodium falciparum* (THIENGSUSUK; CHAIJAROENKUL; NA-BANGCHANG, 2013). No entanto, quando avaliada a plumbagina *in vivo* em tratamento de 4 dias, a droga demonstrou baixa atividade, creditada a uma má biodisponibilidade (SUMSAKUL et al., 2014). Contra parasitas pluricelulares, a plumbagina se mostrou efetiva sobre o próprio agente da esquistossomose, se apresentando como um potencial agente quimioterápico em alternativa aos tratamentos atuais (ZHANG; COULTAS, 2013b).

Figura 19 - Algumas das espécies de plantas citadas das quais é possível extrair a Plumbagina.



Fontes: A- https://toptropicals .com/catalog/uid/plumbago_zeylanica.htm . B- https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+1005+0312. C- https://toptropicals.com/catalog/uid/Plumbago_indica.htm. D- https://srplandscapeguide.com/eplant.php?plantnum=25044&letter=b&return=l4 E- http://www.growsundews.com/sundews/drosera_intermedia_tropical_birdsnest_sundew.html. A - *Plumbago zeylanica L*. B - *Plumbago europaea*. C - *Plumbago indica*. D - *Plumbago scandens*. E- *Drosera intermédia*.

2.6 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Substâncias liberadas em coleções hídricas, ainda que sejam compostos naturais, podem gerar mutações e danos genéticos a qualquer organismo, não apenas o alvo pretendido. Caso ocorram mutações somáticas (ocorrem em células somáticas, aquelas responsáveis pela formação de tecidos e órgãos e por sua vez, geralmente não são transmitidas) que gerem neoplasias, alguns indivíduos serão perdidos, embora geralmente não seja de grande impacto para a população local. Por outro lado, a ocorrência de mutações germinativas (ocorrem em células germinativas, que originam gametas, e por sua vez podem ser repassadas às próximas gerações) leva a consequências mais graves, como perda de gametas, morte fetal ou má formações embrionárias, ou seja, afetam a reprodução e manutenção da densidade populacional da espécie (WATANABE, 2008). Embora seja de grande interesse que isto ocorra com o organismo alvo, não é interessante que aconteça com outras espécies locais, e, portanto, é necessário o desenvolvimento de testes de ecotoxicicidade para garantir a segurança do composto utilizado. Outro ponto preocupante, é a descrição prévias dos efeitos tóxicos e deletérios sobre o organismo humano, podendo induzir doenças graves como câncer, inibir importantes funções celulares ou causando danos genéticos (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Estudos ecotoxicológicos avaliam os efeitos de agentes químicos e físicos nas dinâmicas e populações de um ecossistema específico, de modo que fiscaliza o potencial danoso aos organismos expostos (COSTA et al., 2008; VERSONNEN; SOBANSKA; CESNAITIS, 2014). Esses testes são usados para definir limites seguros para as concentrações de droga utilizadas, evitando maiores danos a organismos que não são alvo ou ao ambiente em geral (CHAPMAN, 2002).

Bioensaios de ecotoxicidade podem ser realizados para avaliar os efeitos de forma aguda e crônica. No primeiro, o organismo teste é exposto a diferentes concentrações durante 24 e 96 horas. As respostas a exposição são avaliadas para se determinar a concentração letal capaz de matar 50% da população teste (CL_{50}) e a concentração mínima necessária para a morte de todos os organismos (VALADARES, 2007). Os ensaios de toxicidade crônica, avaliam os efeitos de uma exposição prolongada a substância teste em diferentes concentrações, durante uma parte ou todo o ciclo de vida do organismo teste. O acompanhamento deve ser cuidadoso para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, como os parâmetros de sobrevivência, crescimento e reprodução. Neste caso, o objetivo não é a morte do animal, mas sim analisa-los quanto a seus parâmetros fisiológicos em busca de alterações em suas funções normais (RAND; WELLS; MC CARTHY, 1995).

2.6.1 Bioensaio com *Artemia salina*

A *Artemia salina* (Figura 20) é um microcrustáceo invertebrado com 8-10 mm de comprimento. Quanto a classificação taxonômica, pertence ao reino Animalia, filo Arthropode, Subfilo Crustácea, classe Branchiopoda, subclasse Sarsostraca, ordem Anostraca, família Artimiidae, gênero *Artemia* (ASEM; RASTEGAR-POUYANI; DE LOS RÍOS-ESCALANTE, 2010; DUMITRASCU, 2011). É um organismo primitivo de idade aproximada a 100 milhões de anos, considerados importantes por constituírem um elo entre os níveis superiores e inferiores de um ecossistema. Com dimorfismo sexual, a espécie possui também 4 fases de desenvolvimento, sendo elas náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto (NUNES et al., 2006). O corpo da *A. salina* é dividido em cabeça, tórax e abdômen (DUMITRASCU, 2011).

Figura 20- *Artemia salina*.

Fonte: https://www.psychologymania.com/2013/07/artemia-salina.html Acesso em: 07 / 02 / 2021

A *artemia* é a escolha para testes de toxicidade devido a um conjunto de características intrínsecas como grande potencial reprodutivo, ampla distribuição geográfica, fácil aquisição e manutenção laboratorial, curto ciclo de vida, resistência a manipulação e cistos de fácil eclosão, contribuindo com uma boa reprodutibilidade confiabilidade dos testes, além de baixo custo (COSTA et al., 2008; NUNES et al., 2006; WEIDEBORG et al., 1997).

Este organismo teste tem sido muito utilizado na avaliação de biomoléculas naturais ou sintéticas com potenciais biotecnológicos, por se tratar de um método seguro, prático e de grande custo-benefício (COSTA et al., 2008; MARTINS et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2015; SANTOS et al., 2010). Em ensaios moluscicidas, a avaliação da ecotoxicidade por *Artemia salina* tem sido amplamente utilizada, pois junto com outras avaliações ecotoxicológicas são capazes de indicar limites de concentrações mais seguros para utilização dessas substâncias, evitando ou diminuindo possíveis danos ambientais nos locais de aplicação (ARAÚJO et al., 2018b; CAMARA et al., 2008; MARTINS et al., 2014, 2017; ROCHA-FILHO et al., 2015; SILVA et al., 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*

As sucessivas gerações de colônias de caramujos *B. glabrata* são originárias de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil, e mantidas no mosluscário da Área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os moluscos são mantidos em tanques plásticos com aproximadamente 20L de água filtrada e declorada, com pH 7,0 e temperatura de cerca de 25 ± 3°C alimentados diariamente com alface orgânica fresca *Lactuva sativa* L.

3.2 DROGAS

Plumbagina e todos os reagentes de grau analítico foram obtidos foi obtida da Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA. A niclosamida foi obtida da Baylucide, Bayer®.

3.3 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

A cepa de *Schistosoma mansoni,* cepa Belo Horizonte (BH), é mantida no moluscário da disciplina de Parasitologia da UFPE e no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE através de passagens sucessivas da cepa em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss Webster*. Após a obtenção das cercárias liberadas por caramujos contaminados, é feita a contagem e a média das cercárias por microlitro de água. Os camundongos são anestesiados e expostos à determinada quantia de amostra contendo 50 cercárias. Em cerca de 45 dias o ciclo sexuado no camundongo se completa e se torna possível a liberação de ovos nas fezes.

3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE EMBRIÕES DA *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Grupos de 100 embriões em estágios de blástula (0ª a 15ª h) após a primeira clivagem mitótica), gástrula (24ª a 39ª h), trocófora (43ª a 66ª h), véliger (96ª a 120ª h) e *hippo stage* (144ª -168ª h) foram expostos durante 24 horas a plumbagina com diferentes concentrações em placas de poços com volume de solução final de 2 mL/poço. A solução foi previamente diluída com 0,5% de DMSO e água filtrada e declorada (pH 7,0). Foram realizados três grupos controle, o primeiro com apenas água filtrada declorada, o segundo grupo controle com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.5% e um terceiro com niclosamida como controle positivo. Após a exposição os embriões foram lavados (água filtrada declorada) e transferidos para novas placas com água filtrada declorada, onde foram monitorados durante 8 dias ou até a eclosão de todos os caramujos do grupo controle e avaliados quanto a sua viabilidade (vivos) e inviabilidade (malformações e mortos). Todo procedimento experimental foi realizado em triplicata e de acordo com De Araújo e colaboradores (2018).

3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CARAMUJOS ADULTOS DE *B. GLABRATA*

Caramujos adultos (n=10) medindo entre 10-14 mm de diâmetro de concha entre 2-3 meses de idade e verificados quanto a maturidade sexual através da deposição de desovas, foram expostos a plumbagina durante 24h (25 ± 3 ° C) em diferentes concentrações (2, 2.5, 3, 3.5 e 4 µg/mL) com volume final de 60 mL, para cada solução. Após a exposição, os caramujos sobreviventes foram lavados com água filtrada e declorada, colocados em aquários e observados durante 8 dias consecutivos, com taxa de mortalidade registrada diariamente. Os mesmos parâmetros para os grupos controle do item 3.4 foram mantidos. Foram considerados mortos os indivíduos que apresentaram ausência de movimento, ausência de batimentos cardíacos, retração na concha e/ou liberação de hemolinfa. Para avaliar os efeitos da plumbagina sobre a fertilidade e fecundidade dos caramujos foi observada a postura de ovos dos caramujos sobreviventes por 7 dias consecutivos após 48 horas de exposição. As desovas coletadas foram analisadas até a eclosão

dos embriões do grupo controle 1 e os embriões foram classificados entre viáveis e inviáveis (mortos e malformados). Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Silva et al., 2019a).

3.6 ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ANOMALIAS NUCLEARES NOS HEMÓCITOS DE CARAMUJOS ADULTOS *B. GLABRATA* EXPOSTOS A PLUMBAGINA

As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos estabelecido por Lima et al. (2019). Caramujos (n=10) foram expostos as concentrações de 2 - 3.5 µg/mL por 24 h e após o período de exposição foram mantidos em água filtrada e declorada (pH 7,0) por mais 24 horas. Novamente foram realizados três grupos controle, o primeiro com apenas água filtrada declorada, o segundo grupo controle com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.5% e um terceiro com niclosamida como controle positivo. Foram selecionados 4 indivíduos de cada grupo aleatoriamente para posterior análise morfológica e quantitativa de hemócitos (Pavlica et al., 2000). Foram coletados 100 µL de hemolinfa e colocados em lâminas de microscopia óptica. Em seguida, foi adicionada em cada amostra 100 µL de solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) diluído em solução de Ringer a 10 mM. Após esse procedimento, cada lâmina foi colocada em uma câmara úmida por 30 min. Após o período de incubação, as células foram fixadas com 200 µL de glutaraldeído a 1% em solução de Ringer por 5 min. As lâminas foram subsequentemente lavadas com solução de Ringer, coradas com Giemsa (10% em água destilada) por 7 minutos, e posteriormente lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. Para cada concentração foram confeccionadas no mínimo 4 lâminas. Os hemócitos (n = 1000/lâmina) foram analisados em microscópio óptico binocular em objetiva de 100 ×, para avaliar a frequência das alterações hemocitárias (micronúcleo, binucleação e apoptose). Uma alíquota de 10 µL de hemolinfa foi coletada, diluída 1: 1 em solução de Ringer e aplicada a um hemocitômetro para contagem total de células, sendo aplicada a seguinte fórmula para estimar o número de células por mL de hemolinfa (Silva et al., 2019a):

Número de células / mL de hemolinfa = (número total de células / Número de quadrantes contados) X fator de diluição X 10000

3.7 ENSAIO COMETA

Possíveis danos ao DNA, quebras de DNA de fita simples, causados pela plumbagina foram averiguados por ensaio de Eletroforese em gel de célula única de acordo com metodologia adaptada (Singh et al., 1988; Grazeffe et al., 2008). Duas lâminas histológicas foram cobertas com agarose de fusão normal a 1,5% dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e mantida durante a noite à temperatura ambiente. Caramujos de 10-14 mm de diâmetro de concha foram expostos a diferentes concentrações da plumbagina por 48 h. Após 24 h do fim da exposição, a hemolinfa de 7 indivíduos de cada grupo foi coletada com o auxílio de micropipeta com ponteiras siliconadas e colocada em Eppendorfs previamente siliconados. Cerca de 100 µL dessa hemolinfa foi dissolvido em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}), e colocado na primeira camada de gel a 37°C, seu volume dividido entre 2 lâminas por caramujo. Após solidificação a 4°C por 10 min, as lâminas foram imersas em um frasco contendo solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e sulfóxido de dimetil 10% (DMSO)), a 4°C overnight e protegidas da luz. Após a lise, as lâminas foram colocadas em tanque de eletroforese horizontal e imersas em tampão de eletroforese alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13) por 20 minutos para permitir o desenrolar do DNA e a exposição de locais danificados. Para eletroforese o DNA, foi aplicada uma corrente elétrica de 0,74 V/cm e 300 mA por 20 min a 4°C. Os tratamentos alcalinos e eletroforéticos foram realizados em banho de gelo e sob luz fraca para evitar a ocorrência de danos adicionais ao DNA.

Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em tampão Tris (Tris 0,4 M, pH 7,5) para neutralização durante 15 min, fixadas com etanol absoluto por 10 min e coradas com 30 µL de Syber safe. De cada lâmina, 50 células foram examinadas visualmente e classificadas de acordo com os níveis de dano ao DNA (Lee; Steinert, 2003). O exame das lâminas foi feito em microscópio de fluorescência (Olympus BX 60, Japão) equipado com filtro de excitação 488 nm e filtro barreira de 520 nm (aumento de 1000).

3.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE *S. MANSONI*

Caramujos adultos (n=15) de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* (cepa Belo Horizonte) foram expostos por 2 h a luz artificial (60 W) para liberação de cercárias. Aproximadamente 100 cercárias foram expostas a 1 mL de plumbagina, preparada como descrito no ponto 2.4, nas concentrações de 1, 1.5, 2, 2.5 e 3 µg/mL (28° C ±3). A avaliação utilizou score de motilidade empregando os seguintes parâmetros: movimentação atípica, movimentação no próprio eixo, ritmo lento e ausência de motilidade (morte) nos intervalos de 15, 30, 60 e 120 minutos de exposição em microscópio estereoscópico (LM360BZ, Lumen, Brasil)**.** O grupo controle foi realizado nas mesmas condições apenas com água filtrada declorada. A niclosamida foi utilizada para o controle positivo, na concentração de 1 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicatas com resultados expressos da seguinte forma: Ausência de morte (-), menos de 50% de morte (+), superior a 50% de morte (++) e 100% de mortalidade (+++) (Silva et al., 2019b).

3.9 AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE AMBIENTAL DA PLUMBAGINA SOBRE *ARTEMIA SALINA*

Para o ensaio de toxicidade ambiental, ovos encistados de *A. salina* (50 mg) foram colocados em recipientes com água do mar (pH 8), sob luz artificial (60W) e aeração constante em temperatura de 25 ± 2˚C por 48 h para eclosão. Em seguida, as larvas obtidas foram separadas em grupos (n=10) e submetidas às concentrações de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.25, 2.5 e 3 da plumbagina, então incubadas em água do mar, por 24 h na mesma temperatura. Controles foram realizados com água do mar, dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% e niclosamida. Os testes foram realizados em quadruplicatas e a avaliação da mobilidade das larvas foi realizada através de microscópio estereoscópico (LM360BZ, Lumen, Brasil) (Araújo et al., 2018).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média ± desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparação entre os grupos. Quando a ANOVA revelou uma diferença significativa, o pós-teste de Turkey foi usado para identificar a diferença entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As concentrações letais CL 10, CL 50 e CL 90 (10, 50 e 90% das amostras) foram determinadas através de análise Probit com intervalo de confiança de 95%, para o teste de embriotoxicidade, análise moluscicida com *B. glabrata e análise de ecotoxicidade com A. salina* A regressão Probit foi calculada pelo método de Finney onde os resultados foram obtidos pela razão entre os valores Log (dose) e probit. A transformação do log foi realizada automaticamente pelo programa estatístico StatPlus® 2009 Professional software (AnalystSoft, Canadá).

4 ARTIGO - Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of plumbagin in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818 - intermediate host) and cercaricidal activity against the infectious agent of schistosomiasis mansoni

ARTIGO DUBMETIDO AO PERIÓDICO

PEST MANAGMENTE SCIENCE

Editor-chefe: Stephen O. Duke.

Fator de impacto: 4,845

2020 Journal Citation Reports (Clarivate Analytics): 9/91 (Agronomia) 5/102 (Entomologia)

ISSN on-line: 1526-4998.

© Sociedade da Indústria Química

Qualis Capes: A1 (novo qualis)

Carta de submissão em anexo 1.

Página de submissão da plataforma do periódico em anexo 2.

Dados de submissão na plataforma em anexo 3.

Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of plumbagin in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818 - intermediate host) and cercaricidal activity against the infectious agent of schistosomiasis mansoni

Wilza Wanessa Melo França[1,2], Adriana Maria da Silva[2], Emily Gabriele Marques Diniz[2], Hianna Arely Milca Fagundes Silva[3], Dewson Rocha Pereira[3], Ana Maria Mendonça Albuquerque De Melo[3], Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho[4], Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque[2,5], Hallysson Douglas Andrade de Araújo[3,4], André de Lima Aires[1,2,5]

Affiliation

[1]Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.
[2]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.
[3]Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.
[4]Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil
[5]Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil

Abstract

BACKGROUND: Snails of the genus *Biomphalaria spp* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, the main etiological agent of schistosomiasis *mansoni*, which affects about 236,6 million people in tropical and subtropical regions of the world. The World Health Organization recommends the population control of vector snails as one of the strategies to reduce the prevalence and incidence of schistosomiasis. In this study, molluscicidal and antiparasitic activities of plumbagin, a naturally sourced

naphthoquinone with a range of biological effects, were evaluated against *B. glabrata* and cercariae of *S. mansoni*.

RESULTS: After 24 h of exposure, plumbagin demonstrated molluscicidal activity at low concentrations against embryos (LC_{50} of 0.56, 0.93, 0.68, 0.51 and 0.74 µg/mL for the blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage, respectively) and adult snails (LC_{50} of 3.56 µg/mL). There were no changes in exposed snails fecundity or fertility; However, plumbagin was able to increase the frequency of DNA damage and the number of hemocytes, with apoptosis and binucleation being the main hemocyte alterations. In addition, plumbagin showed death of *S. mansoni* cercariae in the concentration of 1.5 µg/mL in 60 min, while showing moderate toxicity to *Artemia salina*.

CONCLUSION: Plumbagin proved to be a promising substance for the control of *B. glabrata* population, intermediate host of *S. mansoni*, as well as the cercariae, infective stage for the man (definitive host), while being moderate toxic to *A. salina,* crustacean widely used in ecotoxicity tests.

Key-world: Comet assay, Embryotoxicity, Hemocytes, Molluscicidal, Naphthoquinone, schistosomiasis.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a neglected infectious disease that affects about 236.6 million people worldwide and puts another 779 million at permanent risk of infection[1]. The etiological agents of schistosomiasis are helminths of the genus *Schistosoma* spp. which need snails as intermediate hosts, an essential part to complete their life cycle[2]. In the Americas, schistosomiasis has as its etiological agent *S. mansoni* and snails of the genus *Biomphalaria* spp as intermediate hosts[3,4]. In Brazil, there are three species of epidemiological interest, *B. glabrata, B. straminea* and *B. tenagophila*, with *B. glabrata being* the main species involved in the transmission and maintenance of cases. This is due to the wide geographic distribution of *B. glabrata*, in addition to their high rate of reproduction, ease of natural infection and high capacity for releasing cercariae, an infective evolutionary phase for humans, the definitive host of *S. mansoni*[4,5].

The World Health Organization (WHO) recommends three main measures to interrupt the transmission of S. *mansoni*: periodic and large-scale treatment with

praziquantel (PZQ), the only drug available; guaranteeing access to potable water and basic sanitation; and population control of vector snails[1]. Mass treatment with PZQ aims to reduce the contamination of water collections with feces containing eggs eliminated by the infected, and consequently prevent the infection of snails and the release of cercaries, in addition, to reduce the morbidity and mortality of the infection. However, this strategy has not been shown to be effective in reducing the prevalence and incidence of schistosomiasis, in addition to being responsible for the development of resistance and/or tolerance of *Schistosoma* strains against PZQ[6,7]. Thus, given the absence or scarcity of investments in basic sanitation, population control of vector snails becomes a priority strategy for reducing *Schistosoma* spp infection[8]. According to WHO recommendations, this control can be performed using molluscicide agents[9,10].

Niclosamide is the WHO recommended molluscicide for population control of intermediate hosts of *Schistosoma spp*. However, this molluscicide, of synthetic origin, has low biocidal selectivity, high cost for application, instability under sunlight, causes skin and mucosal irritability, in addition to inducing resistance and/or tolerance in snail strains[11,12,13]. Thus, the scientific community recommends the search for new molluscicide candidates, of natural or synthetic origin, which are biosafe, stable, have selective action, considered cost-effective in production and application, and that have action against snails in embryonic and adult stages [14,15,16].

Among several natural secondary metabolites produced by plants used in traditional medicine and pharmaceutical industries, naphthoquinones, a class of naphthalene derivatives, have a broad pharmacological and biological spectrum[17,18]. Studies have reported the action of naphthoquinones against immature stages and adults of *S. mansoni* and *S. haematobium*, and toxicity against embryos and adults of the species *B. alexandrina, B. glabrata and Bulinus truncatus*, vectors of medical importance[19,20,21]. The naphthoquinone plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (Figure 1)) is isolated from several species of the *Plumbago* genus and stands out for its antioxidant[22], anti-inflammatory[22], antibacterial and antifungal activities[23], anti-tumor activities, and in cell apoptosis[24]. Like other naphthoquinones, plumbagin exerts its biological and pharmacological effects through protein and/or DNA alkylation and oxi-redox imbalance[24,25,26].

Artemia salina is widely used in the toxicity assessment of natural or synthetic molecules with biotechnological potential, as in molluscicide screening. This biological

model is used for being a safe, practical, cost-effective and highly sensitive method[27,28,29,30,31]. Therefore, this study reports for the first time the toxicity of plumbagin against embryos (blastula, gastrula, trochophore, veliger, and hippo stage) and adults of *B. glabrata*, its cytotoxic and genotoxic effect, cercaricidal activity against cercariae of *S. mansoni,* and ecotoxicological evaluation against *Artemia salina*.

Materials and methods

Drugs

Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone ($C_{11}H_8O_3$, molecular weight 188.18)) from *Plumbago indica* was obtained from Sigma Chemical (https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/product/sigma/p7262), St. Louis, MO, USA. Niclosamide was obtained from Bayluscide, Bayer®. All analytical reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Maintenance of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* strains

The *B. glabrata* and *S. mansoni* strains (BH strain, Belo Horizonte – MG, Brazil) are maintained through successive generations in the molluscarium of the Department of Tropical Medicine of the Medical Sciences Center and Animal Facility of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE). The molluscs were kept in plastic tanks (50 x 23 x 17 cm) with 20 L of filtered and dechlorinated water, pH 7.0, at 25 ± 3°C, 12 h of light/dark cycle, and fed daily with fresh organic lettuce (*Lactuca sativa L*.).

Assessment of plumbagin toxicity on *B. glabrata* embryos

Embryos of *B. glabrata* were collected from adult specimen spawns that were deposited on transparent polyethylene sheets (8 X 8 cm). Groups of 100 embryos at the blastula stage (0-15 h after the first cleavage), gastrula (15-26 h), trochophore (26-66 h), veliger (66-120 h), and hippo stage (120-144 h) were selected with the aid of a stereoscopic microscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland)[32]. The experimental groups were formed from the selection of a varying number of egg masses (between 3-6), so that each group contained 100 embryos. The selected spawns were intact and

had only one embryo per egg. The experimental groups were exposed to different concentrations of plumbagin (0.3, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5 and 2 µg/mL). Each of these concentrations was tested in triplicate, as were the control groups. Soon, 300 embryos were exposed to each concentration, as were the control groups. Embryos were placed in plastic Petri dishes (60 mm x 15 mm) and each group was exposed for 24 h to the concentrations (0.3 - 2 µg/mL) of plumbagin, previously diluted in 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO) and filtered dechlorinated water (pH 7.0). For each embryonic stage, the experiment was performed with two negative control groups, the first with embryos exposed to only filtered dechlorinated water and the second with embryos exposed to a 0.5% DMSO solution in filtered dechlorinated water. A third group was formed by embryos exposed to 1 µg/mL of niclosamide (NCL), as a positive control. After exposure (24 h) the embryos were washed in dechlorinated filtered water and transferred to new plates with dechlorinated filtered water (pH 7.0, at 25 ± 3°C), where they were monitored for 7 days after their first cleavage, at the hatching time of the control group snails. Embryos were evaluated to determine the percentage of viability (alive) and non-viability (malformations and dead). The entire evaluation of the effect of plumbagin against embryos was performed twice under the same conditions, but at different times. Each time, all concentrations and control groups were evaluated in triplicate to ensure data and statistical analysis reliability.[29,30,31].

Evaluation of the toxicity of plumbagin on adults of *B. glabrata*

Adult snails measuring 10-14 mm in shell diameter, 2-3 months of age, and which sexual maturity was proven through spawning deposition were selected for the trials. Each concentration of plumbagin (2, 2.5, 3, 3.5 and 4 µg/mL) was evaluated on groups containing 10 subjects in the same container for 24h. All concentrations were evaluated in triplicate, so that at the end 30 snails were exposed to each concentration. *B. glabrata* (n= 10/group) were exposed for 24 h to different concentrations (2-4 µg/mL) of plumbagin, previously diluted in 0.5% DMSO and dechlorinated filtered water (pH 7.0, a 25 ± 3°C) for a final volume of 60 ml per concentration. Three groups of snails were selected to form two negative controls and one positive control, as described in the embryotoxicity assay. The snails were observed for behavior during the first hours of exposure. After exposure, the surviving snails were washed with filtered and dechlorinated water, transferred to aquariums, and monitored every 24 h for 8

consecutive days for assessment of mortality. Snails with the absence of heartbeat, presence of shell retraction, and/or hemolymph release were considered dead.

To assess the fertility and fecundity of the snails, the spawns were collected daily during the mortality assessment interval, kept in separate Petri dishes, and monitored for 7 consecutive days regarding their embryonic development. With the aid of a stereoscopic microscope, the spawns and embryos were analyzed and classified into viable and non-viable (dead and malformed). The molluscicidal evaluation of plumbagin was performed twice under the same conditions but at different times. Each time, all concentrations and control groups were evaluated in triplicate to ensure data and statistical analysis reliability.[29,30,31.]

Analysis of micronuclei and nuclear anomalies in hemocytes of adults *B. glabrata*

Analyses were performed as established by Silva et al., 2019.[30]. Snails (n=10) were exposed to the same concentrations of plumbagin as in item 2.7 for 24 h and after the exposure period, they were kept in filtered and dechlorinated water (pH 7.0) for another 24 h. The same parameters for the negative and positive control groups of item 2.4 were maintained. Four individuals from each group were randomly selected for further morphological and quantitative analysis of hemocytes. A 100 µL sample of hemolymph was collected and transferred to conventional light microscopy slides. Then, 100 µL of EDTA solution (ethylenediaminetetraacetic acid) diluted in 10 mM Ringer's solution was added to each sample. After this procedure, each slide was placed in a humid chamber for 30 min. After the incubation period, cells were fixed with 200 µL of 1% glutaraldehyde in Ringer's solution for 5 min. The slides were subsequently washed with Ringer's solution, stained with Giemsa (10% in distilled water) for 7 min, and then washed with distilled water and dried at room temperature. For each concentration, at least four slides were made. Hemocytes (n =1000/slide) were analyzed under a binocular optical microscope with a 100 × objective, to assess the frequency of hemocyte alterations, classified as micronucleus, binucleation, or apoptosis.

A 10-µL aliquot of hemolymph was collected, diluted 1:1 in Ringer's solution and applied to a hemocytometer for total cell count, using the following formula to estimate the number of cells per mL of hemolymph[30]:

$$\frac{Number\ of\ cells}{mL\ of\ hemolymph} = \left(\frac{total\ number\ of\ cells}{number\ of\ quadrants\ counted}\right) \times dilution\ factor \times 10000$$

Comet assay

Possible DNA damage or single-stranded DNA breaks caused by plumbagin were investigated by single-cell gel electrophoresis assay according to adapted methodology[33,34]. Microscope slides were covered with 1.5% normal fusion agarose dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) (free of Ca^{2+} and Mg^{2+}) and kept overnight at room temperature. Snails with a shell diameter of 10-14 mm were exposed to different concentrations (2-3.5 µg/mL) of plumbagin for 48 h. Twenty-four hours after the end of exposure, the hemolymph of 7 individuals in each group was collected with the aid of a micropipette with siliconized tips and placed in previously siliconized Eppendorfs. About 100 µL of this hemolymph was dissolved in 100 µL of 0.5% low-melting agarose (PBS free of Ca^{2+} and Mg^{2+}), and placed in the first layer of gel at 37°C, its volume was divided between 2 blades per snail. After solidifying at 4°C for 10 min, the slides were immersed in a flask containing a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide, DMSO), at 4°C overnight and protected from light. After lysis, slides were placed in a horizontal electrophoresis tank and immersed in alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min to allow DNA unwinding and exposure of damaged sites. For DNA electrophoresis, an electrical current of 0.74 V/cm and 300 mA was applied for 20 min at 4°C. Alkaline and electrophoretic treatments were carried out in an ice bath and under dim light to prevent further DNA damage. Two negative control groups, one with only dechlorinated filtered water and the other with 0.5% DMSO solution in dechlorinated filtered water, and one positive control group with the genotoxic substance methyl methanesulfonate (MMS) were performed.

After electrophoresis, the slides were immersed in Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) for neutralization for 15 min, fixed with absolute ethanol for 10 min, and stained with 30 µL of Syber safe. From each slide, 50 cells were visually examined and classified according to levels of DNA damage[35]. The slides were examined using a fluorescence microscope (Olympus BX 60, Japan) equipped with a 488 nm excitation filter and a 520 nm barrier filter (1000 magnification). Nuclei observed during the analysis and quantification of the slides were divided into 5 categories (0-4) according

to the damage verified in the genetic material. Category 0 indicates that there was no damage while categories 1 to 4 indicate an increasing level of damage to genetic material. To determine the degree of DNA damage in hemocytes, the Damage Index (DI) was used as an essential parameter. The DI was calculated according to the formula: DI = 0 (damage 0) + 1 (damage 1) + 2 (damage 2) + 3 (damage 3) + 4 (damage 4).

Evaluation of the toxicity of plumbagin on cercariae of *S. mansoni*

Adult snails (n=15) of *B. glabrata* infected with *S. mansoni* (Belo Horizonte strain) were exposed for 2 h to artificial light (60 W) to release cercariae. Approximately 100 cercariae were exposed to 1 ml of plumbagin, prepared as described in point 2.4, at concentrations of 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 µg/ml (28°C ±3). The evaluation was according to a motility score using the following parameters: atypical movement, movement on the axis, slow rhythm, and absence of motility (death) at intervals of 15, 30, 60, and 120 min of exposure under a stereoscopic microscope (LM360BZ, Lumen, Brazil). Two negative control groups were performed, one with only dechlorinated filtered water and the other with 0.5% DMSO solution in dechlorinated filtered water. Niclosamide was used for the positive control, at a concentration of 1 µg/mL. Assays were performed in triplicate with results expressed as follows: absence of death (-), less than 50% death (+), greater than 50% death (++) and, 100% mortality (+++)[29].

Assessment of the ecotoxicity of plumbagin on *Artemia salina*

For the environmental toxicity test, encysted eggs of *A. salina* (50 mg) were placed in containers with sea water (pH 8), under artificial light (60 W) and constant aeration at a temperature of 25 ± 2˚C for 48 h for hatching. Then, the larvae obtained were separated into groups (n=10) and subjected to concentrations of 0.5, 1, 1.5, 2, 2.25, 2.5, and 3 of plumbagin, then incubated in seawater for 24 h at the same temperature. Controls were performed with sea water, 0.5% DMSO, and niclosamide. Tests were performed in quadruplicate and larvae mobility was evaluated using a stereoscopic microscope (LM360BZ, Lumen, Brazil)[29,30,31].

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used for comparison between groups. When ANOVA revealed a significant difference, the Tukey post-hoc test was used to identify the difference between groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$. These analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, US). The lethal concentrations LC_{10}, LC_{50}, and LC_{90} (10, 50, and 90% of the samples) were determined by Probit analysis with a 95% confidence interval, for the embryotoxicity test, molluscicide analysis with *B. glabrata*, and analysis of ecotoxicity with *A. salina.* The Probit regression was calculated by the Finney method where the results were obtained by the ratio between the Log (dose) and probit values[36]. Log transformation was performed automatically by the statistical program StatPlus® 2009 Professional software (AnalystSoft, Canada).

Results

Plumbagin has an embryotoxic and teratogenic effect against *B. glabrata*

Plumbagin was active against *B. glabrata* embryos at all life stages (Figure 2 A-E), with a dose-dependent effect. This effect was significant ($p<0.0001$) for blastula at a concentration of 0.3 µg/mL and 100% lethality was reached at 2 µg/mL for gastrula (Figure 2 A and B). For blastula, trochophore, and veliger stages, 100% lethality was achieved at a concentration of 1 µg/mL (Figure 2 A, C, and D) and for hippo stage at a concentration of 1.5 µg/mL (Figure 2 E). Lethal concentrations for 50% (LC_{50}) of embryos ranged from the minimum 0.513 (Veliger) to maximum 0.929 µg/mL (gastrula) and for 90% (LC_{90}) ranged from minimum 0.702 (veliger) to maximum 1.348 µg/mL (gastrula) (Table 1). Throughout the experiment, all life stages of the two negative control groups (C and C+DMSO) showed equal behavior in development morphology (Figure 3 A-E) and 100% viability (Figure 2). Exposure to niclosamide (1 µg/mL) was 100% lethal for all embryonic stages (Figure 2 and Figure 3 F-J). The morphological alterations of the embryotoxic activity of plumbagin on *B. glabrata* are shown in Figure 3. Among the toxic and teratogenic effects, we observe dead embryos (Figure 3H), hydropic embryos (Figure 3M) as the most frequent alteration among malformed ones, and embryos with developmental delay (Figure 3O) (Figure 3 K-O).

Plumbagin has a molluscicide effect but doesn't alter the fecundity and fertility of adults of *B. glabrata*

Figure 4A shows the mortality rate of *B. glabrata* adults exposed to plumbagin for 24 h and evaluated every 24 h for eight consecutive days. The concentration of 2.0 µg/mL did not cause death in the first days; only 6.66% lethality was registered at the end of the observation period. The concentration of 2.5 µg/mL caused 3.33%, 13.33% and 16.66% lethality at 24, 48 and 192 h, respectively. Soon after exposure to plumbagin (time 0 h), concentrations 3.5 and 4.0 µg/mL caused lethargy, shell retraction, increased mucus production and after 6 h the snails released hemolymph. Additionally, concentrations 3.0, 3.5 and 4.0 µg/mL caused a lethality of 20%, 40% and 80%, respectively after 24 h and reached a lethality of 37%, 60% and 100% after 48 h (Figure 4 A). No lethality was observed in the negative control groups (filtered water with or without DMSO), while the group exposed to niclosamide had 100% lethality within 24 h.

According to the results (Figure 4 B), there were no changes in the fecundity (number of embryos/snails) and fertility (embryo viability) parameters of the snails exposed to plumbagin when compared to controls.

Plumbagin causes hemocytic changes in adults of *B. glabrata*

Cytomorphological analysis of *B. glabrata* hemocytes showed mainly two cell types: granulocytes (Figure 5 A), star-shaped cells with pseudopod emission, and hyalinocytes (Figure 5B), containing greater nucleus/cytoplasm ratio and homogeneous cytoplasm without granules. All concentrations of plumbagin caused cytomorphological changes, with apoptosis (Figure 6-B1), binucleation (Figure 6-C1), and micronucleus (Figure 6-D1) being the most frequent. At low frequency, it was possible to find hyalinocytes with a decondensed nucleus and low-visible cytoplasm (Figure 5C), hyalinocytes with cytoplasmic vacuoles (Figure 5D), trinucleated cells (Figure 5E), cells with a reniform nucleus (Figure 5F) or joined cells (Figure 5 H).

Figure 6 expresses the total number of hemocytes (Figure A), the frequency of apoptosis (B), binucleation (C), and micronuclei (D) in *B. glabrata* adults exposed to plumbagin. The hemocyte population showed a significant increase at concentrations of 2.5, 3 ($p < 0.05$) and 3.5 µg/mL ($p < 0.001$). Regarding the frequency of hemocytic

alterations, there was no difference between groups C and C+DMSO, where the mean frequency of apoptosis (Figure 6 B) was 18.67 ± 5.51 and 19.67 ± 11.59 out of 1000 cells, respectively. Binucleation (Figure 6 C) and micronuclei (Figure 6 D) were not visualized in groups C and C+DMSO. On the other hand, apoptosis was the most frequent and significant hemocytic alteration in snails exposed to plumbagin. At concentrations of 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 µg/mL the mean frequency of apoptosis was 113 ± 10.54, 202.7 ± 26.08, 207 ± 40.04 and 182.7 ± 24.21/1000 cells respectively (Figure 6B). Despite the low frequency, binucleation was seen in groups exposed to plumbagin with a frequency ranging from 2 ± 2 to 9.67 ± 2.08 (Figure 6C). Micronucleus was the rarest alteration found at concentrations of 2.5-3.5 µg/mL with a mean frequency of 0.67 ± 1.15, 1 ± 1, and 1 ± 1, none of them statistically significant compared to controls. The 4.0 µg/mL concentration was not evaluated as it was considered a lethal concentration.

Plumbagin causes DNA damage in *B. glabrata* hemocytes

In Figure 7, the levels of damage (0-4) in hemocyte DNA after exposure to plumbagin were observed using the comet assay. The damage index to genetic material caused by plumbagin was dose dependent (Figure 8 A) and significant when compared to the C+DMSO control group, corroborating with the frequency of cells with almost or totally destroyed nucleus, damage 3 or 4, as shown in Figure 8 B.

Plumbagin was toxic against *S. mansoni* cercariae

Changes in motility, such as intense vibratory movement without locomotion, were observed within the shortest time interval (15min) at concentrations of 2 and 2.5 µg/mL, although all cercariae were still alive. On the other hand, even in this interval, 3.0 µg/mL of plumbagin caused 35% mortality of cercariae with separation of the cercarial body and the tail (Figure 9C), while the others were found adhered to the plate and with reduced movement. At a concentration of 1.0 µg/mL of plumbagin, mortality occurred after 60 min, reaching 100% mortality after 120 min. In other concentrations, 100% mortality occurred after 60 min. The cercariae from the negative control groups (C and C+DMSO) showed typical movement and structural preservation, while niclosamide caused 100% lethality within 15 min of exposure.

Environmental ecotoxicity assessment of plumbagin on *Artemia salina*

The results of ecotoxicity using the bioindicator *A. salina* exposed to different concentrations of plumbagin are shown in Figure 10. Plumbagin at concentrations between 0.5 - 2.0 µg/mL did not cause significant mortality to *A. salina*. On the other hand, at concentrations of 2.25 and 2.5 µg/mL, larvae survival was 52.5 and 20%, respectively. The C+DMSO group had 100% survival, similar to the C control group. Total mortality was observed in *A. salina* exposed to niclosamide (1 µg/mL).

Discussion

Naphthoquinone compounds have already been evaluated for their embryotoxic and molluscicidal action against *Schistosoma* spp vector snails[21,37,38,39]. However, no study reported the exposure of naphthoquinone compounds to all embryonic and adult stages of *Biomphalaria spp,* which may limit the knowledge of the effectiveness of these compounds in an environment with different evolutionary stages of *Biomphalaria spp,* with epidemiological importance in schistosomiasis. This is the first study to report the toxicity of plumbagin, a naphthoquinone compound, against all embryonic stages, as well as its cytotoxic and genotoxic effect on adults of *B. glabrata*, action against *S. mansoni* cercariae (BH strain, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brazil) and ecotoxicity against *A. salina*.

It is recognized that early embryonic stages are less susceptible to molluscicidal agents[29,30]. In our study, the blastula and gastrula stages resulted in 50% inviability (dead and malformed) in LC_{50} of 0.556 and 0.929 µg/mL of plumbagin, while for the hippo stage the LC_{50} was 0.745 µg/mL (Table 1). Santos et al. evaluated the toxicity of 14 naphthoquinone compounds against blastula, considered 7 of these compounds promising molluscicide once they have reached unviability in LC_{50} ranging from 00.45-27.68 µM[21]. The toxicity of lapachol and isolapachol on *B. glabrata* blastula was evaluated by Lima et al. reaching an LC_{50} of 1,414 and 0.330 µg/mL, respectively, results similar to the studies by Santos et al. [38,39]. The effectiveness of molluscicide candidates against embryos depends on their permeability in spawn. According to Santos et al., Lima et al. and Santos et al., the molluscicidal potential of naphthoquinone compounds is dependent on their polarity[21,38,39]. As a rule, derivatives with non-polar substituents presented the highest molluscicidal activities. According to

our results, we believe that plumbagin had a better molluscicidal effect, reaching lower LC_{50} values when compared to other compounds due to its methyl radicals[21,38,39,40,41].

Molluscicides capable of morphological changes in embryos are important as it can make the snail's hatching capacity unfeasible or reduce its reproductive capacity, consequently reducing the mollusc population and transmission risks of *S. mansoni*.[21,42] Embryos with developmental delays, malformed and hydropic were also the alterations found in the study by Santos et al., similar to our results[21]. Embryos with nonspecific malformations can be classified as teratomorphic, such as exogastrulation, or hydropic embryos. These damaged embryos do not develop, usually leading to death before or after hatching such as indicated in the studies of Silva et al., Araújo et al. and Batista et al.[29,30,31].

Here, the LC_{50} of plumbagin was 3,558 µg/mL against adults of the species *B. glabrata,* LC_{50} similar to lapachol (3,283 µg/mL) and isolapachol (3,049 µg/mL) against adult snails of the same species[39]. In studies by Santos et al. and Camara et al., the LC_{50} of a series of naphthoquinone and 2-hydroxy-[1,4]-naphthoquinone compounds and derivatives against adults *B. glabrata* ranged from 28.98 to 102.24 µM and 2.1 to 64.3 µg/mL, respectively[21,39,40]. The association of artemisinin-naphthoquinone phosphate against adult snails *Bulinus truncatus* and *B. alexandrina,* intermediate hosts of *S. haematobium* and *S. mansoni*, respectively, resulted in LC_{50} of 7.5 and 16.87 µg/mL, respectively[19,20]. Thus, the molluscicidal behavior may depend on the snail species in addition to the chemical structure of the naphthoquinone derivative.

From the *in silico* identification of naphthoquinone compounds and their molluscicidal experimental evaluation, Santos et al., report behavioral changes in *B. glabrata such* as lethargy, confinement in the shell and mucus secretion[21]. In our study, after 6 h of exposure to plumbagin, these same behavioral changes were visualized, in addition to the release of hemolymph, suggesting rupture of the external membranes[21]. These tissue damages can alter the reproductive capacity and homeostasis of snails, in addition to affecting the maintenance of intramolluscan stages of *S. mansoni* and, therefore, interrupting the continuity of the biological cycle[43]. Furthermore, the fecundity and fertility of snails exposed to molluscicides are important, as a single snail that survives the exposure is able to repopulate the region in a few days, due to the hermaphroditic character of the species[44]. Plumbagin does not change these parameters, unlike the ether extract of *Ramalia aspera* and latex of *Euphorbia milli* var. *Hislopii*[30,44], molluscicidal substances capable of causing

alterations in the fertility and fecundity patterns of adults *B. glabrata*. At the time of this writing, we have not found studies that addressed the effect of naphthoquinone compounds on fecundity and fertility in snails of medical importance for the control of schistosomiasis.

We emphasize that our study with *B. glabrata* embryos and adults is in line with the recommendations by the WHO, which states that a substance presents itself as molluscicide when it is capable of causing 90% mortality (LC_{90}) in equal or less than 20 µg/ml during 24 h of exposure[46].

Hemocytes are components of the immune system of molluscs, such as *B. glabrata*, and constitute the main and immediate cellular defense against antigens and toxic substances[47,48]. Thus, the quantitative and qualitative evaluation of hemocytes is the subject of study for the search of new molluscicide candidates, as well as for the elucidation of its mechanism of action[30,43,49]. In the present study, *B. glabrata* exposed to plumbagin LC_{50} showed an increase in circulating hemocytes and hemocytic alterations, especially apoptosis, micronucleus, and binucleation (Figure 5). The increase in blood cells can occur through two mechanisms; the first is the reversible migration of hemocytes from tissues to the hemolymph upon contact with the offending agent; and second through the recruitment and activation of hemocytes to eliminate cells that have undergone changes, especially apoptotic cells[50,51]. As of this writing, we have not found any studies reporting the effect of naphthoquinone compounds on *B. glabrata* hemocytes. However, our results are similar to studies on the molluscicidal effect of the ether extract of *Ramalia aspera*, essential oil from the leaf of *Croton rudolphianus*, and potassium usnate[30,43,52]. We emphasize that in our evaluation the frequency of cells undergoing apoptosis was higher than that reported in the aforementioned studies.

The comet assay is a sensitive method for assessing DNA damage in individual cells (Figure. 7). The approach consists of analyzing the electrophoretic DNA migration of nucleotides obtained after cell lysis in a thin agarose layer[53]. The DNA damage of *B. glabrata* exposed to plumbagin was concentration dependent (Figure. 8), as demonstrated in the studies by Siqueira et al. when evaluating the exposure of *B. glabrata* to toxic chemicals[54,55]. Regarding quinones, Osman et al., when evaluating the exposure of *Dreissena polymorpha* (mussels) to menadione and lawsone reported toxicity and damage to the DNA of this mollusc[56]. These authors report that damage caused by quinones to molluscuan DNA occurs from the formation of reactive oxygen

species (ROS). Following what was proposed by Osman et al. and based on the observed damage to the hemocyte nuclei, very similar to what happens after exposure to free radicals, we suggested that the molluscicidal effect of plumbagin was due to its reducing potential capable of forming ROS, causing damage to DNA. This hypothesis is supported by other studies where plumbagin exerted its activity through oxi-redox imbalance[24,26,56].

It is desired that a molluscicide candidate present in addition to action against *B. glabrata* embryos and adults, also possesses cercarcidal action. The elimination of cercariae in the aquatic environment prevents human infection and consequently interrupts the continuity of the biological cycle of *S. mansoni.* Additionally, Colley et al. highlight that the cercaricide assessment is important since 100,000 to 300,000 cercariae can be eliminated daily by a single snail[57]. The artemycin-naphthoquinone phosphate combination against cercariae of *S. mansoni* and *S. haematobium* resulted in 100% lethality after 15 min of exposure at a concentration of 16.8 and 7.5 µg/mL, respectively, with emphasis on morphological alterations of the tail and cercarian body, in addition to the separation of the cercarian body and tail[19,20]. In the present study, plumbagin showed a cercarcidal action against *S. mansoni* (BH strain, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brazil) after 15 min of exposure, resulting in 100% lethality after 60 min at a concentration of 1.5 µg/mL. We emphasize that different strains of *S. mansoni* can show differences in lethality when exposed to the same substance, as can be concluded from the studies by Zhang and Coultas[58]. In the Zhang and Coultas studies, plumbagin caused total lethality at concentrations of 0.5 and 1.0 µg/mL after 180 min and 5.0 µg/mL after 60 min of exposure against *S. mansoni* cercariae (Strain NIH-SM-PR2)[58]. Furthermore, separation of the cercarian body and tail found in our results may be associated with increased muscle contraction caused by plumbagin as reported by Zhang and Coultas[58].

Although causing an environmental impact due to its nonspecific action, niclosamide is still the WHO molluscicide of choice for population control of snails that are of medical importance for the control of schistosomiasis[10,59]. The results achieved by plumbagin highlight that its molluscicidal action and reduced ecotoxicity against *A. salina,* compared to niclosamide, can effectively and safely contribute to the control of schistosomiasis *mansoni*.

Conclusions

The results of the present study demonstrate that plumbagin proved to be a promising compound for the development of a molluscicidal agent for the control of the population of *B. glabrata*, intermediate host of *S. mansoni*, showing toxicity to adults and embryos at all developmental stages. The molluscicidal effect of plumbagin against adults *B. glabrata* can be assigned to its cytotoxicity to hemocytes and damage to the DNA. Furthermore, plumbagin caused mortality of *S. mansoni* cercariae, an infectious evolutionary stage to the definitive host. Plumbagin was moderately toxic against *A. salina*, however, showed lower toxicity than niclosamide, the molluscicide recommended by WHO.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Support for Researchers linked to UFPE 's Graduate Programs (nº 03/2020 and nº 02/2021). Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) by the Researcher Fixation Scholarship to H.D.A. de Araújo (BFP0080-2.08/20).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1 WHO, Schistosomiasis (2021) Available: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis [accessed 5 july 2021].

2 McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ and Zhou XN, Schistosomiasis. Nat Rev Dis Primers **4**:13 (2018).

3 Noya O, Katz N, Pointier JP, Theron A and Noya BA, Schistosomiasis in America, in Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean, ed by Franco-Paredes C, Santos-Preciado J, Neglected Tropical Diseases. Springer, Vienna, pp. 16-26 (2015).

4 Katz N, Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helmintoses. Belo Horizonte: Instituto René Rachou; Available:https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662 [accessed 5 July 2021].

5 Barbosa CS, Loyo RM, do Nascimento WRC, Gomes EC de S, da Silva BM, dos Santos GM and da Silva JAM, Inquérito malacológico em localidades endêmicas para esquistossomose em Pernambuco, Brasil. REAS **11:** 1-9 (2019).

6 Assaré RK, Tian-Bi YNT, Yao PK, N'Guessan NA, Ouattara M, Yapi A, Coulibaly JT, Meïté A, Hürlimann E, Knopp S, Utzinger J and N'Goran EK, Sustaining control of schistosomiasis mansoni in Western Côte d'Ivoire: results from a SCORE study, one year after Initial praziquantel administration. PLoS Neglected Trop Dis **10**(1):e0004329 (2016).

7 Wiegand RE, Mwinzi PNM, Montgomery SP, Chan YL, Andiego K, Omedo M, Muchiri G, Ogutu MO, Rawago F, Odiere MR, Karanja DMS and Secor WE, A persistent hotspot of *Schistosoma mansoni* infection in a five-year randomized trial of praziquantel preventative chemotherapy strategies. J Infect Dis **217**(10):1672 (2018).

8 Moloo, A. Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain progress (2020). Available: https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress. [accessed 6 July 2021]

9 McCullough F, The role of molluscicide in schistosomiasis control. (1992). Available: http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_SCHISTO_92.107.pdf [accessed 6 July 2021].

10 Sokolow SH, Wood CL, Jones IJ, Swartz SJ, Lopez M, Hsieh MH, Lafferty KD, Kuris AM, Rickards C and De Leo GA, Global assessment of Schistosomiasis control over the past century shows targeting the snail intermediate host works best. PLoS Negl Trop Dis **10**(7):e0004794 (2016).

11 Oliveira-Filho EC, Paumgartten FJ, Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. Ecotoxicol Environ Saf. **46**(3):342-50 (2000).

12 Coelho P and Caldeira RL, Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. Infect Dis Poverty **5**(1):57 (2016).

13 Faria RX, Rocha LM, Souza EPBSS, Almeida FB, Fernandes CP and Santos JAA, Molluscicidal activity of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Acta Trop **178**:163-168 (2018).

14 WHO, Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers (2017). Available: https://www.who.int/publications/i/item/9789241511995 [accessed 10 July 2021].

15 Alzabib AA, Abobakr Y, Al-Sarar AS, Hussein HI, Basuda, OA, El-Gamal AA, Abdel-Kader MS and El_Komy MH, Molluscicidal activity of cardiac glycosides isolated from *Adenium obesum*. Pest. Manag. Sci **75**: 2770-2775 (2019).

16 Matos, J.L., da Silva, K.R., de Lima Paula, L.A., Cunha, W.R., Ramos, S.B., Rodrigues, V., Cabral, F.J. and Magalhães, L.G, Molluscicidal and cercaricidal activities of curcumin on *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Pest Manag Sci **76**: 1228-1234 (2020).

17 Fowler P, Meurer K, Honarvar N and Kirkland D, A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen **834**:6-17 (2018).

18 Alferova VA, Shuvalov M, Korshun VA and Tyurin A, Naphthoquinone-derived polyol macrolides from natural sources. Russ. Chem. Bull **68**. 955-966 (2019).

19 El-Beshbishi SN, El Bardicy S, Tadros M, Ayoub M and Taman A, Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina*. Acta Trop **141**(Pt A):37-45 (2015).

20 El-Beshbishi SN, El Bardicy S, Tadros M, Ayoub M and Taman A, Biological activity of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma haematobium* stages and the vector *Bulinus truncatus*. Trans R Soc Trop Med Hyg **113**(6):320-325 (2019).

21 Dos Santos DB,Filho JT, Melo A, Araujo Lemes J, Silva L, Lopes Rocha T, Andrade C, Neves B and Bezerra JC, In silico-driven identification of novel molluscicides effective against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). New J. Chem **4**, 16948-16958 (2020).

22 Pai SA, Munshi RP, Panchal FH, Gaur IS, Mestry SN, Gursahani MS and Juvekar AR. Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation

and oxidative stress. Biomed Pharmacother **111**:686-694 (2019).

23 Hassan STS.,Berchová-Bímová K, and Petráš J, Plumbagin, a plant-derived compound, exhibits antifungal combinatory effect with amphotericin B against *Candida albicans* clinical isolates and anti-hepatitis C virus activity. *Phytother Res* **30**:1487–1492 (2016).

24 Tsao YC, Chang YJ, Wang CH and Chen L, Discovery of isoplumbagin as a novel NQO1 substrate and anti-cancer quinone. Int. J. Mol. Sci **21**(12):4378 (2020).

25 Hakura A, Mochida H, Tsutsui Y and Yamatsu K, Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. Chem Res Toxicol **7**(4):559-67 (1994).

26 Shang Y, Chen C, Li Y, Zhao J and Zhu T, Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1,4-naphthoquinone. Environ Sci Technol. **46**(5):2935-42 (2012).

27 Martins, M. C. B. et al. Usnic acid potassium salt: An alternative for the control of Biomphalaria glabrata (Say, 1818). PLoS ONE, **v. 9**, n. 11, 2014.

28 Procópio, T. F. et al. Schinus terebinthifolius leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of Aedes aegypti larvae. PLoS ONE, **v. 10**, n. 5, 2015.

29 Araújo HAD, Silva LRS, Siqueira WN, Fonseca C, Silva HS, Melo AMMA, Martins M and Lima VLM, Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. Acta Trop **179:** 39-43 (2018).

30 Silva HAMF, Sá JLF, Siqueira WN, Lima MV, Martins MCB, Aires AL, Albuquerque MCPA, Falcão EPDS, Buril MLL, Pereira EC, Melo AMMA and Silva NHD, Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop **196**:172-179 (2019).

31 Batista JJ, de Araújo HDA, Aguiar TWA, Ferreira SAO, Lima MV, Pereira DR, Ferreira MRA, Soares LAL, Melo AMMA, Albuquerque MCPA, Aires AL, Coelho LCBB. 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 Apr; **228**:106312.

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

33 Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res **175**(1):184-91 (1988).

34 Grazeffe VS, Tallarico Lde F, Pinheiro Ade S, Kawano T, Suzuki MF, Okazaki K, Pereira CA and Nakano E, Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Mutat Res. **654**(1):58-63 (2008).

35 Lee RF and Steinert S, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat Res. **544**(1):43-64 (2003)

36 FINNEY DJ. The adjustment for a natural response rate in probit analysis. Ann Appl Biol. 1949 Jun; **36**(2):187-95. doi: 10.1111/j.1744-7348.1949.tb06408.x. PMID: 18151945.

37 Santos AF, Ferraz PA, Pinto AV, Pinto M do C, Goulart MO and Sant'Ana AE, Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. Int J Parasitol **30**(11):1199-202 (2000).

38 Santos AF, Ferraz PA, de Abreu FC, Chiari E, Goulart MO and Sant'Ana AE, Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. Planta Med **67**(1):92-3 (2001).

39 Lima NM, dos Santos AF, Porfírio Z, Goulart MO and Sant'Ana AE, Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop 83(1):43-7 (2002).

40 Camara CA, Silva TM, da-Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, Pinto AC and Vargas MD, Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. An Acad Bras Cienc **80**(2):329-34 (2008).

41 Ribeiro KA, de Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, López-Montero E, Reys JR, de Oliveira MB, Pinto AV, Santana AE and Goulart MO, Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop **111**(1):44-50 (2009).

42 Araújo PS, Caixeta MB, Brito RDS, Gonçalves BB, da Silva SM, Lima ECO, Silva LD, Bezerra JCB and Rocha TL, Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: Implications for control of intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop **211**:105644 (2020).

43 Araújo HDA, Silva HAMF, Siqueira WN, Santos VHB, Lima MV, Júnior JGS, Silva NH, Albuquerque MCPA, Melo AMMA, Aires AL and Coelho LCBB, 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 **222**:106067 (2021).

44 Teles HMS, Carvalho OS, Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose. In *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar, ed. by Carvalho ODS and Coelho PMZ, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 459–484 (2008).

45 Alberto-Silva AC, Cunha RA, Costa VAD, Santos EGND, Vasconcellos MC, Mello-Silva CC and Santos CP, Behavioral response of *Biomphalaria glabrata* exposed to a sublethal concentration of Euphorbia miliivar. hislopii latex. An Acad Bras Cienc **92**(1):e20190298 (2020).

46 WHO, The control of schistosomiasis: report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 8 to 13 November 1984].Available: https://apps.who.int/iris/handle/10665/39529 [accessed 15 August 2021].

47 Ibrahim AM, Ahmed AK, Bakry FA and Abdel-Ghaffar F, Hematological, physiological and genotoxicological effects of Match 5% EC insecticide on *Biomphalaria alexandrina* snails. Ecotoxicol Environ Saf **147**:1017-1022 (2018).

48 Melo ES, Brayner FA, Junior NCP, França IRS and Alves LC, Investigation of defense response and immune priming in *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*, two species with different susceptibility to *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res **119**(1):189-201 (2020).

49 Galloway TS and Depledge MH, Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology **10**(1):5-23 (2001).

50 Oubella R, Philippe M, Paillard C and Auffret M, Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). Dis Aquat Org **15**(3):193-197 (1993).

51 Russo J and Madec L, Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. Cell Tissue Res **328**(2):431-41 (2007).

52 Ribeiro IATA, Sá JLF, Lima MV, Veras STS, Aguiar JCROF, Aires AL, Albuquerque MCPA, da Silva MV, Melo AMMA, Navarro DMAF and Correia MTS, Toxic effect of *Croton rudolphianus* leaf essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae and *Artemia salina*. Acta Trop **223**:106102 (2021).

53 Afanasieva K and Sivolob A, Physical principles and new applications of comet assay. Biophys Chem **238**:1-7 (2018).

54 Siqueira WN, França EJ, Pereira DR, Lima MV, Silva HAMF, Araújo HDA, Sá JLF and Melo AMMA, Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Chemosphere **249**:126218 (2020).

55 Siqueira WN, de França EJ, Pereira DR, Lima MV, Silva HAMF, Sá JLF, de Araújo HDA and Melo AMMA, Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Environ Sci Pollut Res Int (2021).

56 Osman AM, Rotteveel S, den Besten PJ and van Noort PC, *In vivo* exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: menadione is more toxic to mussels than lawsone. J Appl Toxicol **24**(2):135-41(2004).

57 Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE and King CH, Human schistosomiasis. Lancet **383**(9936):2253-64 (2014).

58 Zhang SM and Coultas KA, Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. Int J Parasitol Drugs Drug Resist **3**:28-34 (2013).

59 King CH, Sutherland LJ and Bertsch D, Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical-based molluscicide for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. PLoS Negl Trop Dis **9**(12):e0004290 (2015).

Tables

Table 1. Lethal concentrations (LC) of plumbagin (µg/mL) after 24 h of exposure on embryos and adults of *B. glabrata* and *A. salina*.

Experimental groups	LC_{10} (µg/mL)	LC_{50} (µg/mL)	LC_{90} (µg/mL)
Blastula	0.278 (0.267 - 0.288)	0.556 (0.546 - 0.566)	0.835 (0.824 - 0.845)
Gastrula	0.510 (0.495 - 0.526)	0.929 (0.914 - 0.944)	1.348 (1.333 - 1.363)
Trochophore	0.407 (0.398 - 0.416)	0.685 (0.676 - 0.694)	0.964 (0.955 - 0.972)
Veliger	0.323 (0.315 - 0.332)	0.513 (0.504 - 0.521)	0.702 (0.694 - 0.711)
Hippo Stage	0.428 (0.418 - 0.438)	0.745 (0.735 - 0.755)	1.062 (1.052 - 1.072)
Adult snails	2.774 (2.683 - 2.865)	3.558 (3.467 - 3.649)	4.342 (4.251 - 4.433)
Artemia salina	1.931 (1.89 - 1.972)	2.264 (2.223 - 2.305)	2.597 (2.556 - 2.638)

Results expressed as mean (Standard error).

Table 2. Plumbagin activity on *S. mansoni* cercariae by exposure time (15 – 120 minutes).

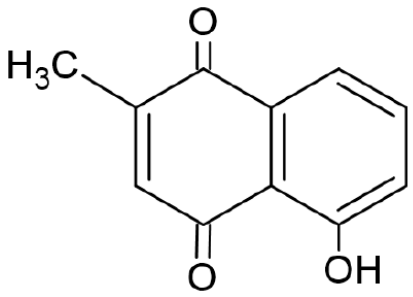
Experimental groups	Exposure time (min)			
	15	30	60	120
C	-	-	-	-
C+DMSO	-	-	-	-
Plumbagin (µg/mL)				
1.0	-	-	+	+++
1.5	-	-	+++	+++
2.0	-	-	+++	+++
2.5	-	+	+++	+++
3.0	+	++	+++	+++
NCL	+++	+++	+++	+++

Negative control: C = filtered and dechlorinated water and C+DMSO = C+DMSO: DMSO 0.5% in filtered and dechlorinated water. Positive control niclosamide at a concentration of 1µg/mL. Absence of lethality (−), elimination of less than 50% of

cercariae (+), elimination of more than 50% of cercariae (++) and complete elimination of cercariae (+++).

Figure List

Fig. 1. Chemical structure of plumbagin.



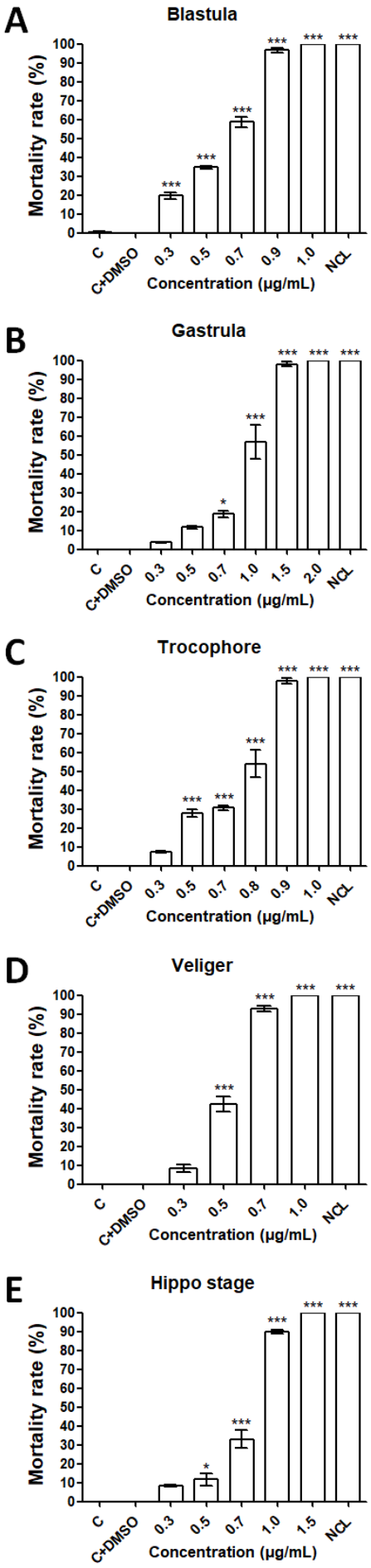


Fig. 2. Toxicity of plumbagin on embryonic stages of *B. glabrata.* (A) blastula, (B) gastrula, (C) trochophore, (D) veliger and (E) hippo stage. C: Filtered and dechlorinated water. C+DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide 1 µg/ml. Significant differences *p < 0.05 when compared to negative control C+DMSO.

Fig. 3. *B. glabrata* embryos exposed to 0.5% dimethylsufoxide in filtered and dechlorinated water (A-E, x400), niclosamide (1µg/ml) (F-J x400), plumbagin (K-O x400). In A, F and K (0.9 µg/mL) blastula stage. In B, G and L (1.5 µg/mL) gastrula stage. In C, H, and M (0.8 µg/mL) trochophore stage. In D, I and N (0.7 µg/mL) veliger stage. In E, J and O (1.0 µg/mL) hippo stage stage. Morphological changes in embryos: 1 - healthy; 2 - dead; 3 - hydropic; 4 - developmental delay.

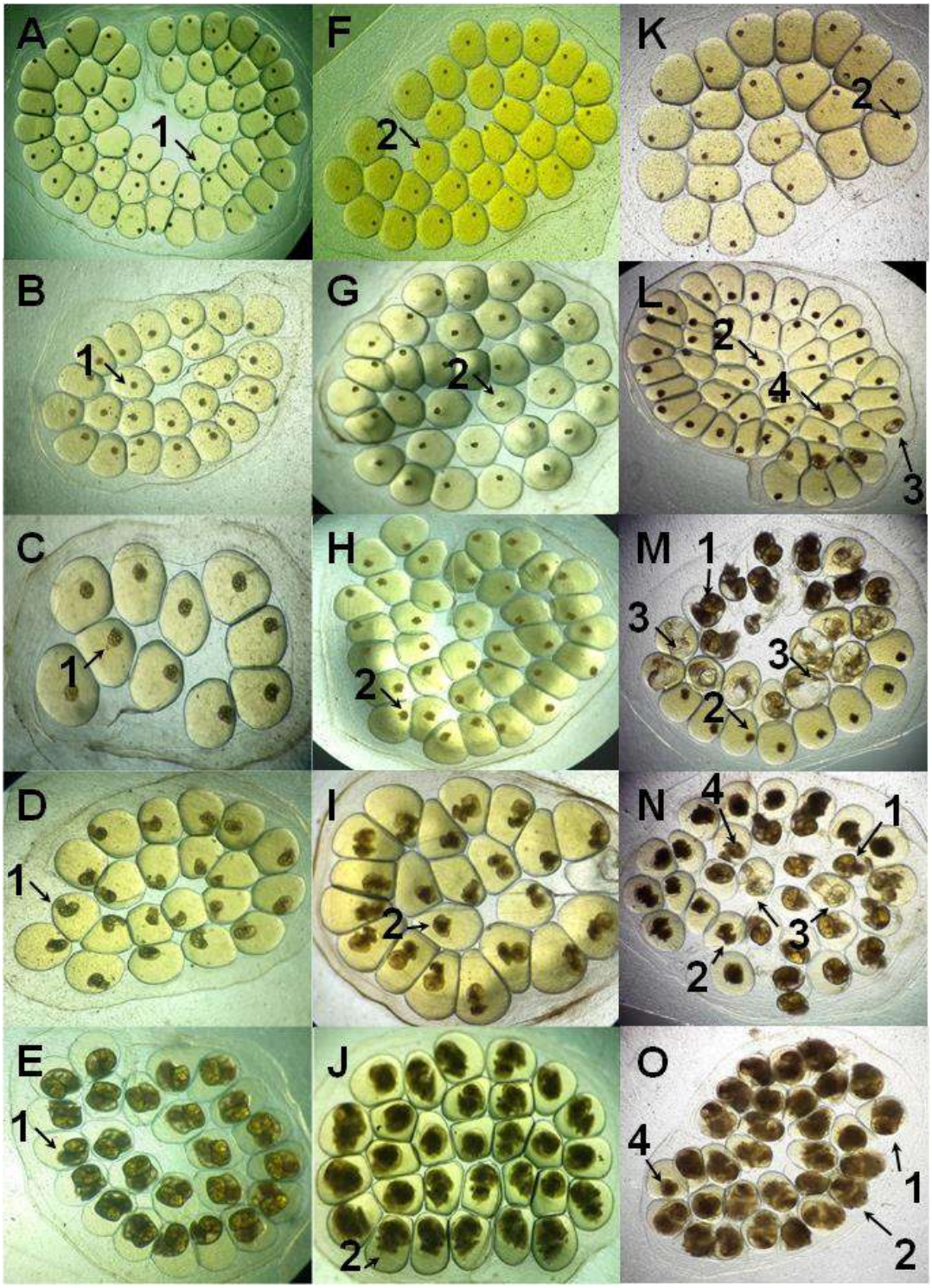


Fig. 4. Mortality rate (A) and fecundity and fertility (B) of adults of *B. glabrata* exposed to plumbagin for 24 hours and evaluated for 8 consecutive days after exposure. C: Filtered and dechlorinated water. C+DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide 1 µg/ml. Plumbagin concentrations in µg/mL-1.

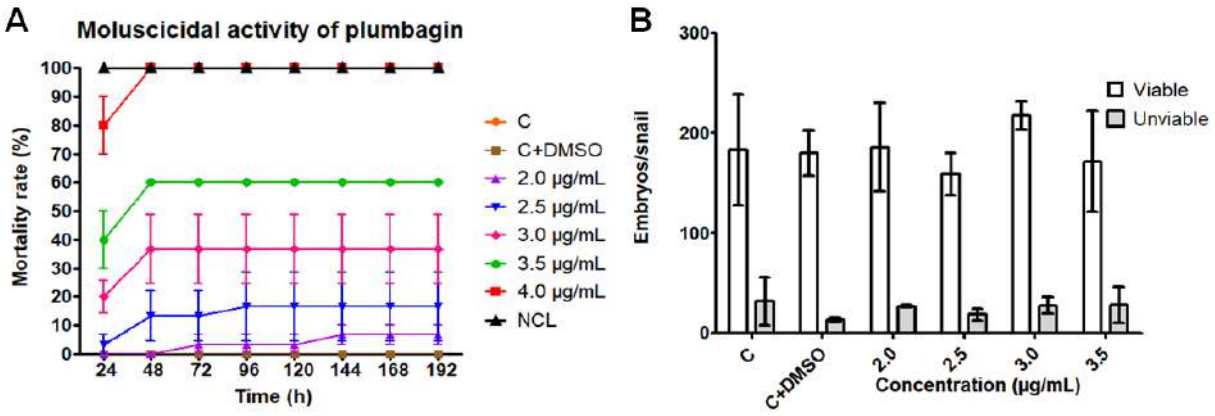


Fig. 5. *B. glabrata* hemocytes. (A) Granulocyte hemocytes and (B) Hyalinocyte hemocyte – Control group exposed to 0.5% DMSO. (C) Hyalinocyte hemocyte with decondensed nucleus (arrow) and non-visible cytoplasm, (D) Hyalinocyte hemocyte with vacuoles and fragmented nucleus (arrow indicates vacuoles in the cytoplasm; * indicates a region with nucleus fragments.) , (E) Trinucleate granulocyte hemocytes (each of the arrows indicates one of the nuclei), (F) Hyalinocyte hemocyte with kidney-shaped nucleus (arrow indicates site of invagination in nucleus), (G) Binucleate granulocyte hemocyte in apoptosis (each of the arrows indicates one of the nuclei; * indicates vacuolated cytoplasm) and (H) united Hemocyte granulocytes (arrow indicates union point between the two cells) in apoptosis of adult snails exposed to plumbagin.

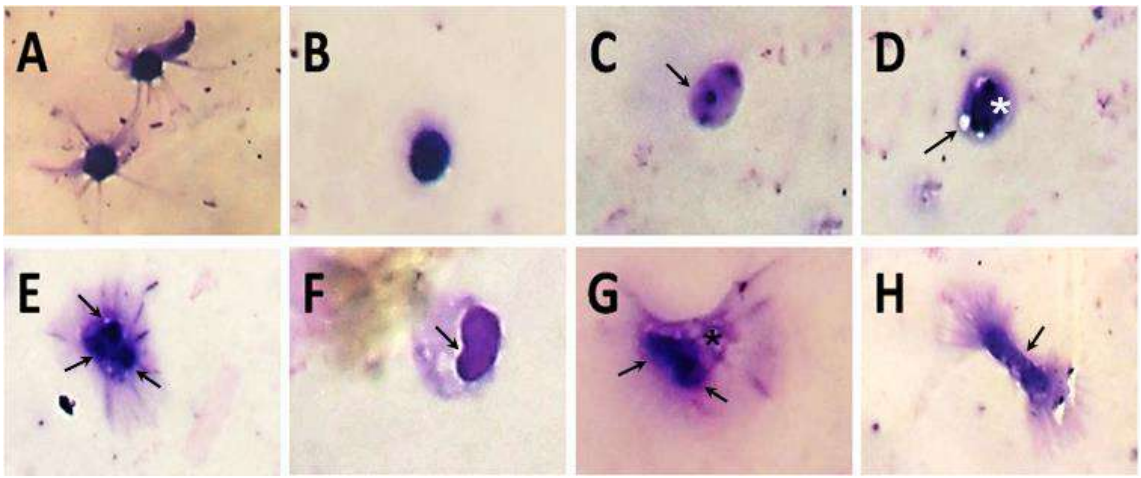


Fig 6. Morphological and quantitative alterations of *B. glabrata* hemocytes exposed to plumbagin. (A) Count of hemocytes/mL of hemolymph. (B) Number of apoptosis per 1000 analyzed cells. (C) Number of binucleation (arrow) per 1000 analyzed cells. (D) Number of micronuclei (arrow) per 1000 analyzed cells. C: Filtered and dechlorinated water. C+DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. Results expressed as mean and standard deviation (SD). *p < 0.05, ***p < 0.001 compared to negative control C+DMSO.

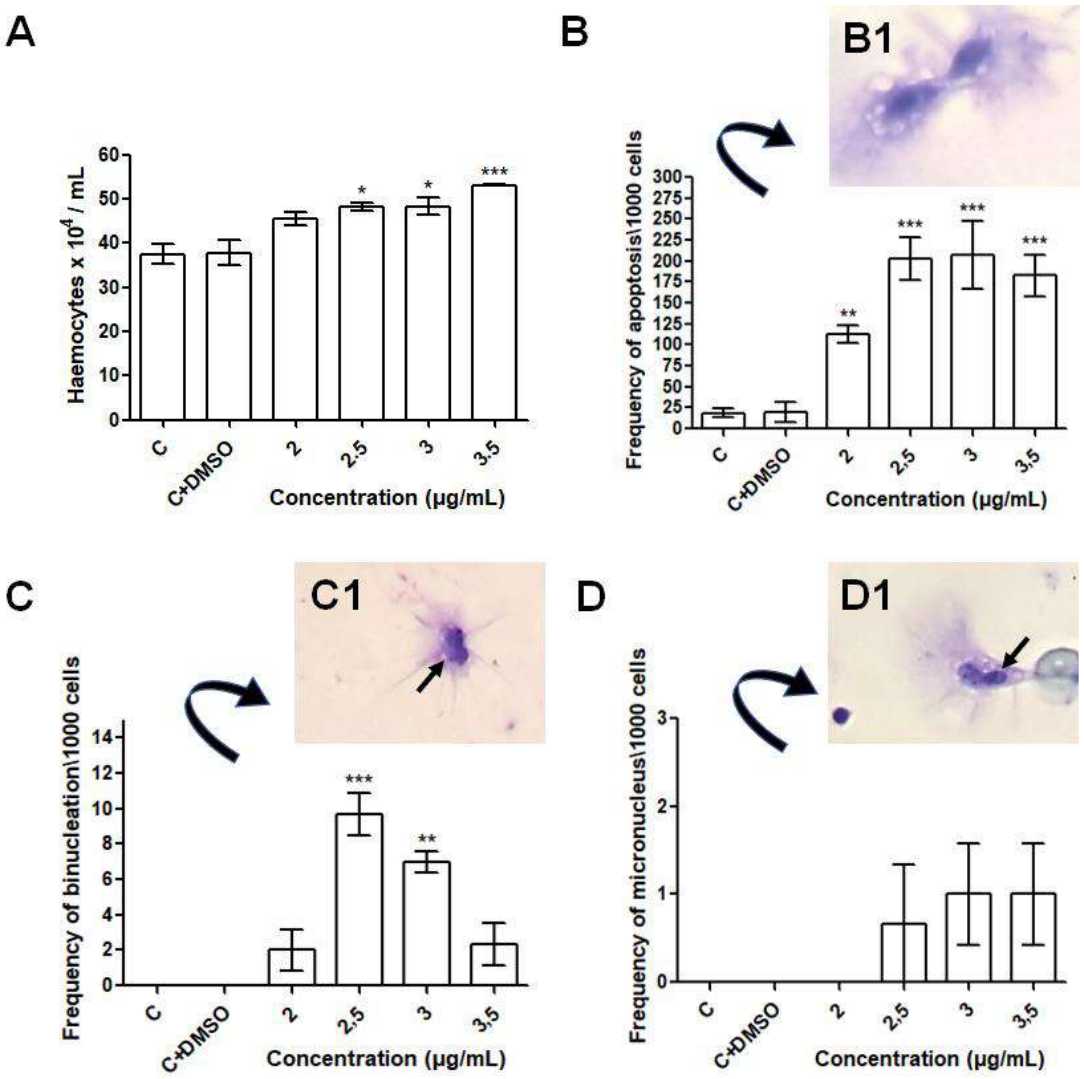


Fig. 7. Comet assay images obtained from *Biomphalaria glabrata* hemocytes, and DNA damage after exposure to different concentrations of plumbagin. In the images, the five degrees of damage (0–4) analyzed and quantified, where 0 indicates absence, 1 (minimum damage) to 4 (maximum damage) indicates increasing DNA damage.

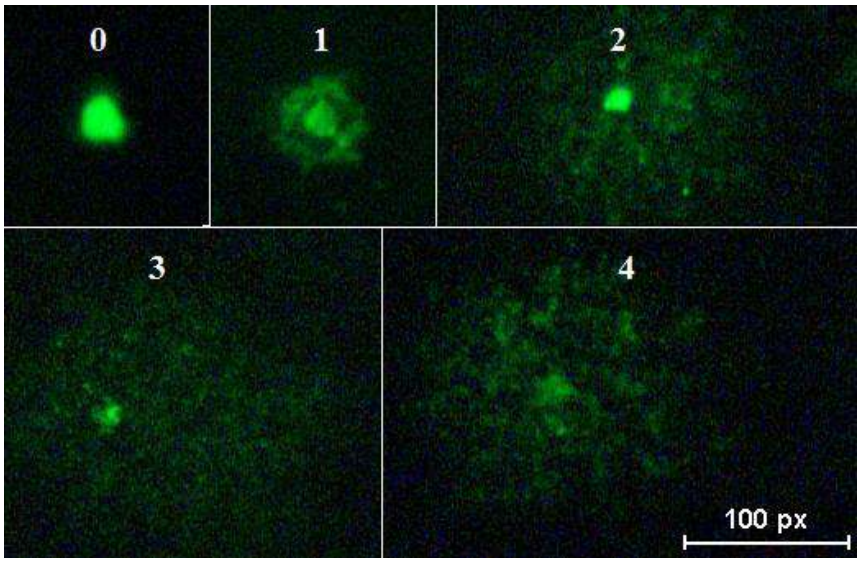


Fig. 8. DNA damage of B. *glabrata* hemocytes determined by the comet assay. Were analyzed 500 cell nuclei per group. In A Damage Index (DI) and B percentage distribution of each damage level by concentration in µg/mL-1. C: Filtered and dechlorinated water, C+DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. MMS: methyl methanesulfonate. The result was expressed as the mean ± standard deviation of the mean. **p<0.01; ***p<0.001 compared to negative control C+DMSO.

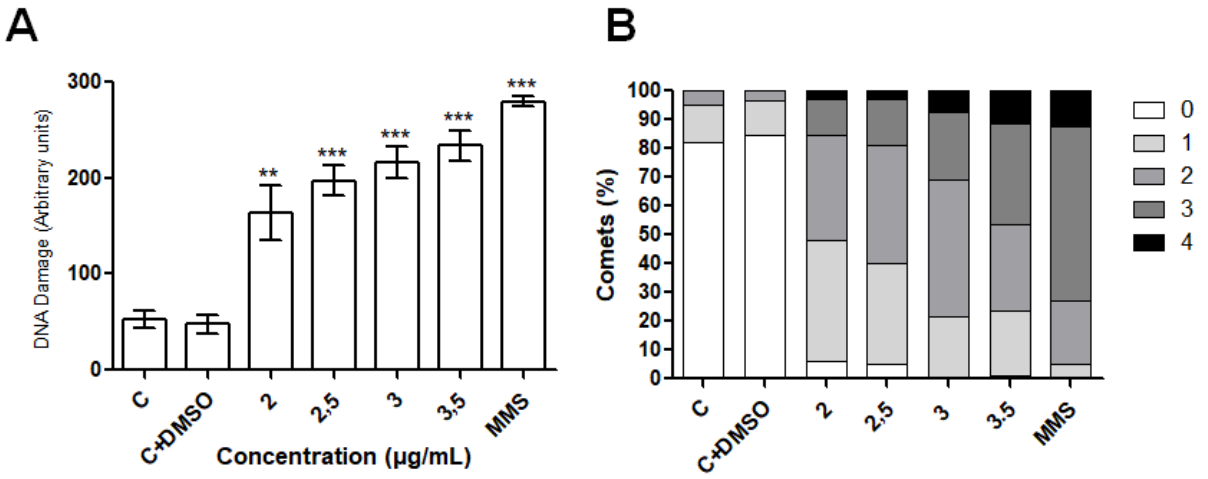


Fig. 9. *Schistosoma mansoni* cercariaes. In A, cercariae exposed to a 0.5% DMSO solution in filtered water (C+DMSO). In B, cercariae exposed to 1 µg/mL Niclosamide with a granular body and a contracted tail. In C, cercariae exposed to 3.0 µg/mL of plumbagin for 15 minutes, highlighting the retraction of the cercarian body and tail, in addition to the separation between the tail and the cercarial body.

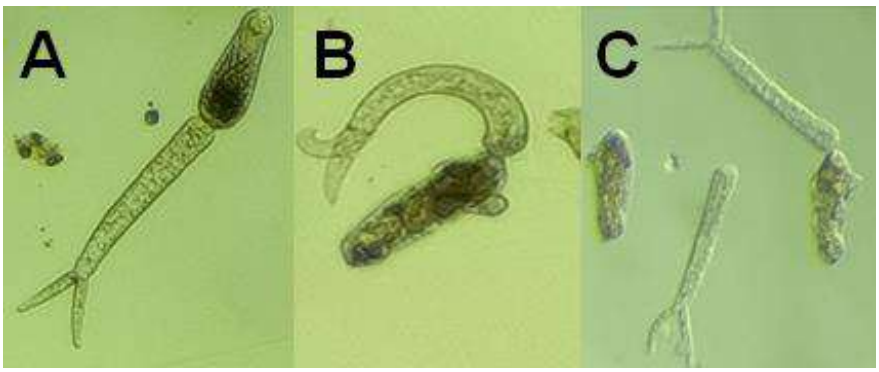
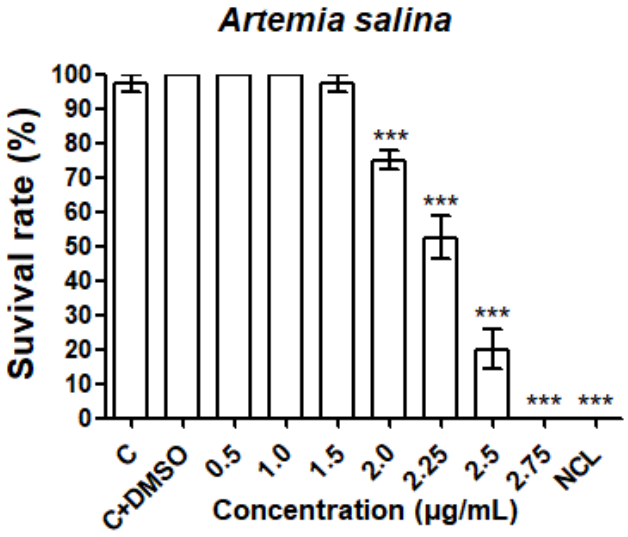


Fig. 10. *Artemia salina* survival rate.



5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- Plumbagina apresenta embriotoxicidade sobre *B. glabrata*, de acordo com os parâmetros embrionários (mortalidade e má-formação) analisados em diferentes estágios evolutivos (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage), após 24 horas de exposição.

- Caramujos adultos de *B. glabrata* se mostraram susceptíveis a plumbagina após 24 horas de exposição, com parâmetros de mortalidade alterados, embora o padram de reprodução não tenha sido alterado.

- Plumbagina foi citotóxica sobre hemócitos de caramujos adultos de *B. glabrata,* demonstrado através da frequência de anomalias nucleares;

- A exposição de de *B. glabrata* à plumbagina causou danos nucleares aos hemócitos, com fragmentação nuclear variando de 0-4.

- Pumbagina apresenta ação cercaricida contra cercárias de *S. mansoni*.

- Ainda que a plumbagina se moderadamente tóxica contra *Artemia salina*, é menos tóxica que a niclosamida.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; OLIVEIRA BRETT, A. M. **Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor**. Biosensors and Bioelectronics, v. 17, n. 11–12, p. 913–919, 2002.

ALFEROVA, V. A. et al. **Naphthoquinone-derived polyol macrolides from natural sources.** Russian Chemical Bulletin, v. 68, n. 5, p. 955–966, 2019.

ANDRADE, Z. DE A. A patologia da Esquistossomose humana. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). ***Schitosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 546–568.

ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. **The biology and toxicology of molluscicides, bayluscide**. Pharmacology and Therapeutics, v. 19, n. 2, p. 245–295, 1982.

ARAÚJO, H. D. A. et al. **Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata***. Acta Tropica, v. 179, p. 39–43, 2018.

ARAÚJO, H. D. A. et al. **Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae**. Acta Tropica, v. 188, p. 132–137, 2018.

ARAÚJO, H. D. A. 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 Tropica, v. 222, 2021.

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

AUGUSTO, R. et al. ***Schistosoma mansoni*: phytochemical effect on aquatic life cycle.** Open Journal of Veterinary Medicine, v. 5, p. 127–132, 2015.

AUGUSTO, Ronaldo de Carvalho. **Efeito da exposição de cercárias de *Schistosoma mansoni* ao látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* no desenvolvimento das formas adultas no hospedeiro definitivo.** 2016. 157 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

BABULA, P. et al. **[Naphthoquinones and their pharmacological properties]**. Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti, v. 56, n. 3, p. 114–20, 2007.

BARBOSA, C. S. et al. **Specific Situations Related to Acute Schistosomiasis in**

Pernambuco, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, n. SUPPL., p. 169–172, 2001a.

BARBOSA, C. S. et al. **Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil**. Cadernos de Saúde Pública, v. 17, n. 3, p. 725–728, 2001b.

BARBOSA, C. S. et al. **The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak**. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 7, p. 878–883, 2011.

BARBOSA, C. S. et al. **Casos autóctones de esquistossomose mansônica em crianças de Recife, PE.** Revista de Saude Publica, v. 47, n. 4, p. 684–690, 2013.

BARBOSA, C. S. et al. **Epidemiologia Da Esquistossomose No Litoral De Pernambuco.** Revista de Patologia Tropical, v. 43, n. 4, 2015.

BARBOSA, C. S. et al. **Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil.** Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 6, n. 3, p. 51–58, 2015b.

BARBOSA, C. S. et al. **Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014).** Acta Tropica, v. 164, p. 10–16, 2016.

BARBOSA, C. S. et al. **Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil**. Revista Ambiente e Água, v. 13, n. 3, 2018.
BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1995.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E. **Zoologia dos Invertebrados**. 6° ed. São Paulo: Roca, 1996.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. **Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review.** Journal of Advanced Research, v. 4, n. 5, p. 433–444, 2013.

BERLINCK, R. G. S. et al. **The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century.** Quimica Nova, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BHUWAN B. MISHRA , JALAJ K. GOUR , NAVNEET KISHORE, R.; K. SINGH, V. T. & V. K. T. **An antileishmanial prenyloxy- naphthoquinone from roots of *Plumbago zeylanica*.** Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters, v. 27, p. 480–485, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni : diretrizes técnicas**. [s.l.] Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 1° ed. Brasília: Ministério da Saúde. v. 3, 2017.

BRASIL, M. DA S. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em: 21 jan. 2021.

BRITO, G. **Saiba mais sobre a esquistossomose**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1493&sid=32>. Acesso em: 22 maio. 2020.

CAMARA, C. A. et al**. Molluscicidal activity of 2-hydroxy- [1,4] naphthoquinone and derivatives.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 80, n. 2, p. 329–334, 2008.

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

CARVALHO, O. D. S. et al. **Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014.** Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Único de Saúde do Brasil, v. 27, n. 3, p. e2017343, 2018.

CAVALCANTI, M. G. S.; SANTOS, F. A. B. **Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Schistosoma mansoni*.** 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

CAVALCANTI, M. G. S. et al. **Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea***. Micron, v. 43, n. 2–3, p. 285–291, 2012.

CDC, CENTER FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION-. **Parasites - Schistosomiasis**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>. Acesso em: 19 jan. 2022.

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

CHETTY, K. M. et al. **Pharmaceutical Studies and Therapeutic Uses of *Plumbago Zeylanica L*. Roots (Chitraka, Chitramulamu).** Ethnobotanical Leaflets, v. 10, n. May 2014, p. 294–304, 2006.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S.. **Cimerman: parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** São Paulo; Atheneu; 2 ed; 2005.

COELHO, P. M. Z. et al. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). . ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008a. p. 149–160.

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

COSTA, M. J. F. S.; GRAULT, C. E.; CONFALONIERI, U. E. C. **Comparative study of the fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in a laboratory through self-fertilization and cross-fertilization**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 46, n. 3, p. 157–163, 2004.

CRELLEN, T. et al. **Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* Is Associated with Multiple Rounds of Mass Drug Administration.** Clinical Infectious Diseases, v. 63, n. 9, p. 1151–1159, 2016.

DE PAIVA, S. R. et al. **Antimicrobial Activity in Vitro of Plumbagin Isolated from *Plumbago* Species.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 7, p. 959–961, 2003.

DE SOUZA GOMES, E. C. et al. **Transmissão urbana da esquistossomose: Novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 19, n. 4, p. 822–834, 2016.

DE VASCONCELOS LIMA, M. et al. **Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*.** Environmental Science and Pollution Research, v. 26, n. 4, p. 3350–3356, 2019.

DER VIJVER, L. M. VAN. **Distribution of Plumbagin in the Plumbaginaceae**. Phytochemistry, v. 11, p. 3247–3248, 1972.

DUMITRASCU, M. ***Artemia salina***. Balneo Research Journal, v. 12, n. 1, p. 119–122, 2011.

DUNCAN, J.; STURROCK, R. F. **Laboratory evaluation of potential plant molluscicides.** In: MOTT, K. E. (Ed.). Plant molluscicides. Chichester: John Wiley & Sons, 1987. p. 251–265.

EL-BESHBISHI, S. N. et al. **Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina***. Acta Tropica, v. 141, n. Part A, p. 37–45, 2015.

EL-BESHBISHI, S. N. et al**. Biological activity of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma haematobium* stages and the vector *Bulinus truncatus*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 113, n. 6, p. 320–325, 2019.

FARMANGUINHOS, F. O. C. **Farmanguinhos praziquantel**. p. 1–9, 2018.

FARO, M. J. et al. **Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of Biomphalaria glabrata infected by Schistosoma mansoni.** Experimental Parasitology, v. 134, n. 2, p. 228–234, 2013.

FERRARI, T. C. DE A.; DRUMMOND, S.; REIS, M. G. DOS. Neuroesquistossomose. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 807–820, 2008..

FOWLER, P. et al. **A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone**. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 834, n. July, p. 6–17, 2018.

GENTILE R., SOARES, M. S., BARRETO, M.G. M., GONÇALVES, M. M. L and D'ANDREA Paulo S. (2012). The Role of Wild Rodents in the Transmission of Schistosoma mansoni in Brazil, Schistosomiasis, Prof.Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/the-role-of-wild-rodents-in-the-transmission-of-schistosomamansoni-in-brazil

GREVENSTUK, T. et al. **Inhibitory activity of plumbagin produced by *Drosera intermedia* on food spoilage fungi.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 8, p. 1638–1642, 2012.

HAKURA, A. et al. **Mutagenicity and Cytotoxicity of Naphthoquinones for Ames Salmonella Tester Strains**. Chemical Research in Toxicology, v. 7, n. 4, p. 559–567, 1994.

HASHEESH, W. S. F. et al. **Reproductive and developmental alterations in *Biomphalaria alexandrina* snails exposed to three phenolic compounds.** International Journal of Environmental Studies, v. 77, n. 1, p. 94–107, 2020.

HASSAN, S. T. S.; BERCHOVÁ-BÍMOVÁ, K.; PETRÁŠ, J. **Plumbagin, a Plant-Derived Compound, Exhibits Antifungal Combinatory Effect with Amphotericin B against *Candida albicans* Clinical Isolates and Anti-hepatitis C Virus Activity.** Phytotherapy Research, p. 1487–1492, 2016.

HOLLINGWORTH, R. M. **Inhibitors and Uncouplers of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation.** Handbook of Pesticide Toxicology, p. 1169–1261, 2001.

HOOK, I. L. I. **Naphthoquinone contents of in vitro cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera* species**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 67, n. 3, p. 281–285, 2001.

HOTEZ, P. J. et al. **Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases**. The Lancet, v. 373, n. 9674, p. 1570–1575, 2009.

ITO, C. et al. **Anti-cell proliferation effect of naphthoquinone dimers isolated from *Plumbago zeylanica***. Natural Product Research, v. 32, n. 18, p. 2127–2132, 2018.

JOLLY, E. R. et al. **Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches**. Genome Biology, v. 8, n. 4, 2007.

JONG-BRINK, M. DE; BAGGEN, J. M. C. **Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*.** Parasitology, v. 104, n. 1, p. 33–40, 1992.

KATZ, N.; ALMEIDA, K**. Esquistossomose, xistosa, barriga d´água**. Ciênc. cult. (São Paulo), v. 55, n. 1, p. 38–41, 2003.

KATZ, N. **The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil**. Acta Tropica, v. 108, n. 2–3, p. 69–71, 2008.

KATZ, N**. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses**. Belo Horizonte: CPqRR, 76 p, 2018.

KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RE, L**. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae) - A practical guide to the main stages.** Malacologia, v. 34, n. 1–2, p. 25–32, 1992.

KAWANO, T. et al. **Observation of some key stages of the embryonic development of *Biomphalaria straminea* (dunker, 1848) (molluska, planorbidae).** Invertebrate Reproduction and Development, v. 46, n. 2–3, p. 85–91, 2004.

KING, C. H.; MAHMOUD, A. A. F. **Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. In: FAUCI, A. S. et al. (Eds.).** Medicina interna de Harrison. 19. ed. Rio de Janeiro: Grupo A Educação, 2016.

KODAMA, H. et al. **Evaluation of patients with esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy using multiplanar reconstruction MDCT images.** American Journal of Roentgenology, v. 192, n. 1, p. 122–130, 2009.

LAMBERTUCCI, J. R. **Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 4, p. 422–435, 2010.

LARDANS, V.; DISSOUS, C. **Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission.** Parasitology Today, v. 14, n. 10, p. 413–417, 1998.

LENZI, H. L. et al. **Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo**. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 87–145.

LEWIS, F. A. et al. **The NIH-NIAID schistosomiasis resource center**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 2, n. 7, 2008.

LIMA, K. DE M. et al. **Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica.** Acta Gastroenterologica Latinoamericana, v. 42, n. 4, p. 309–320, 2012.

LIMA, L. **Famílias Planorbidae**. In: BARBOSA, F. S. (Ed.). Tópicos em Malacologia

Médica. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1995. p. 80–112.

LÓPEZ L., L. I.; LEYVA, E.; GARCIA DE LA CRUZ, R. F. **Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales.** Soil Erosion in Europe, p. 311–346, 2006.

LORSUWANNARAT, N. et al. **The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*.** Experimental Parasitology, v. 133, n. 1, p. 18–27, 2013.

LU, J.-J. et al. **Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents.** Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, v. 13, n. 3, p. 456–463, 2013.

MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. **Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni***. In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). *Schitosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 43–84.

MARTINS, M. C. B. et al. **Usnic acid potassium salt: An alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).** PLoS ONE, v. 9, n. 11, 2014.

MARTINS, M. C. B. et al. **Barbatic Acid Offers a New Possibility for Control of *Biomphalaria Glabrata* and Schistosomiasis.** Molecules, v. 22, n. 4, 2017.

MAZIGO, H. D. et al. **Epidemiology and control of human schistosomiasis in Tanzania.** Parasites and Vectors, v. 5, n. 1, 2012.

MCCULLOUGH, F. **The role of molluscicide in schistosomiasis control**World Health Organization, , 1992. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_SCHISTO_92.107.pdf

MELLO-SILVA, C. C. et al. **Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 6, p. 671–674, 2007.

MELLO-SILVA, C. C. et al. **The influence of exposure *to Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*.** Acta Tropica, v. 117, n. 2, p. 101–104, 2011.

MELO, A. L. DE; COELHO, P. M. Z. ***Schistosoma mansoni* e a esquistossomose.** In: NEVES, D. P. (Ed.). Parasitologia humana. 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016. p. 225–246.

MOLOO, A. **Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain progress**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress>. Acesso em: 5 jun. 2021.

NASCIMENTO, G. L. et al. **The cost of a disease targeted for elimination in**

brazil: The case of schistosomiasis mansoni. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 114, n. 1, p. 1–9, 2019.

NEGRÃO-CORRÊA, D. A. et al. ***Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na susceptibilidade ao parasito**. In: CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z. (Eds.). *Schitosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 485–509.

NEVES, D. **Parasitologia humana**. 11° ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NILE, S. H.; PARK, S. W. **Biologically active compounds from *Plumbago zeylanica.*** Chemistry of Natural Compounds, v. 50, n. 5, p. 905–907, 2014.

NIOI, P, HAYES JD. **Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoredutase I to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors.** Mutat. Res., 555, 149-171, 2004.

Noya, O., et al. **Schistosomiasis in America.** (2015). 10.1007/978-3-7091-1422-3_2.

NUNES, B. S. et al. **Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing**. Environmental Pollution, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.

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, n. 3, p. 342–350, 2000.

OLIVEIRA, E. C. A. DE et al. **Investigação sobre os casos e óbitos por esquistossomose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, 2005-2013.** Epidemiologia e servicos de saude: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil, v. 27, n. 4, p. e2017190, 2018.

OMS. **Molluscicide screening and evaluation**. Bulletin of the World Health Organization, v. 33, n. 4, p. 567–581, 1965.

OMS. **Field Use of Molluscicides in Schistosomiasis Control Programmes**. Control of Neglected Tropical Diseases. [s.l: s.n.]. v. 91, ISBN:978 92 4 151199 5, 2017.

OMS. **Guidelines for laboratory and field testing of molluscicides for control of schistosomiasis**. Control of Neglected Tropical Diseases. [s.l: s.n.]. World Health Organization. ISBN:978 92 4 151540 5, 2019.

OMS. **Schistosomiasis**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 5 jul. 2021.

PADHYE, S. et al. **Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its**

analogs. Medicinal Research Reviews, v. 32, n. 6, p. 1131–1158, 2012.

PAI, S. A. et al. **Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation and oxidative stress.** Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 111, n. October 2018, p. 686–694, 2019.

PALASIO, R. G. S. et al. **The current distribution pattern of *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* in the northern and southern regions of the coastal fluvial plain in the state of São Paulo.** Biota Neotropica, v. 15, n. 3, 2015.

PARAENSE, W. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: REIS, F. A. DOS (EDIT) (Ed.). **Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica**. Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina, 1986. p. 117–128.

PARAENSE, W. L. Hospedeiros Intermediários. In: ***Schistosoma* mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 284–308.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. v. 8**.**

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. **Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment**. International Journal for Parasitology, v. 34, n. 4, p. 527–533, 2004.

PIERI, O. S.; FAVRE, T. C. **Diapausa em Biomphalaria glabrata**. In: CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z. (Eds.). *Schistosoma* mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 419–433.

PRATA, A. R.; COURA, J. R. **Fases e Formas Clínicas da Esquistossomose Mansoni.** In: CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Eds.). *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 741–787.

PROCÓPIO, T. F. et al. ***Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae.** PLoS ONE, v. 10, n. 5, 2015.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. **Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais.** Química Nova, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, 2007.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MC CARTHY, L. S. **Introduction to Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assesmen**t. p. 3–67, 1995.

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

Paulo, 2012. doi:10.11606/T.87.2012.tde-21092012-104513.

RAPADO, L. N. et al. **Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 6, 2013.

REY, L. **Parasitologia**. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ROCHA-FILHO, C. A. A. et al. **Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*.** Chemosphere, v. 132, p. 188–192, 2015.

ROQUIS, D. et al. **The epigenome of *Schistosoma mansoni* provides insight about how cercariae poise transcription until infection**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, p. no pagination, 2015.

ROY, A. **Plumbagin: A potential anti-cancer compound**. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 20, 2020.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. **Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca).** Developmental and Comparative Immunology, v. 33, n. 6, p. 725–727, 2009.

SAMBON, L. W. **Remarks on *Schistosoma mansoni*.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 10, p. 303–304, 1907.

SANTOS, A. F. DOS et al. **Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*.** Bioresource Technology, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.

SANTOS, D. B. DOS et al. **In silico -driven identification of novel molluscicides effective against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).** New Journal of Chemistry, v. 44, n. 39, p. 16948–16958, 2020.

SARKAR, A. et al. ***Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase (ThyX) is a target for plumbagin, a natural product with antimycobacterial activity.** PLoS ONE, v. 15, n. 2, 2020.

SCHOLTE, R. G. C. et al. **Predictive risk mapping of schistosomiasis in brazil using bayesian geostatistical models.** Acta Tropica, v. 132, n. 1, p. 57–63, 2014.

SHANG, Y. et al. **Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1,4-naphthoquinone**. Environmental Science and Technology, v. 46, n. 5, p. 2935–2942, 2012.

SILVA CANTINHA, R; de JESUS AMARAL, A. **Influência da radiação gama de alta**

taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de *Biomphalaria glabrata*. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SILVA, H. A. M. F. et al. **Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae**. Acta Tropica, v. 196, n. May, p. 172–179, 2019.

SIMONSEN, H. T. et al. **In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 74, n. 2, p. 195–204, 2001.

SINGH, S. K.; YADAV, R. P.; SINGH, **A. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India**. Journal of Applied Toxicology, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2010.

SIQUEIRA, W. N. DE et al. **Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes**. Chemosphere, v. 249, 2020.

SOKOLOW, S. H. et al. **Global Assessment of Schistosomiasis Control Over the Past Century Shows Targeting the Snail Intermediate Host Works Best.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 7, 2016.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. **Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera**. Quim. Nova, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SOUZA, S. S. **A origem das células de defesa (hemócitos) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2006.

SOUZA, F. P. C. DE et al. **Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history: [review].** Rev. Soc. Bras. Clín. Méd, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

SUMSAKUL, W. et al. **Antimalarial activity of plumbagin in vitro and in animal models.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 14, 2014.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. DOS S**. Implicações da Biologia de *Biomphalaria* no Controle da Esquistossomose.** In: CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z. (Eds.). *Schitosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 459–484.

THIENGSUSUK, A.; CHAIJAROENKUL, W.; NA-BANGCHANG, K. **Antimalarial activities of medicinal plants and herbal formulations used in Thai traditional medicine.** Parasitology Research, v. 112, n. 4, p. 1475–1481, 2013.

TRIPATHI, S. K.; PANDA, M.; BISWAL, B. K. **Emerging role of plumbagin: Cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy**.

Food and Chemical Toxicology, v. 125, p. 566–582, 2019.

TSAO, Y. C. et al. **Discovery of isoplumbagin as a novel nqo1 substrate and anti-cancer quinone.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 12, p. 1–17, 2020.

VALADARES, M. C. **Avaliação De Toxicidade Aguda: Estratégias Após a "Era Do Teste Dl50"**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, 2007.

VALE, N. et al. **Praziquantel for Schistosomiasis: Single- Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance**. Antimicrob Agents Chemother, 2017.

VEGA, S. G. et al. **Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide.** Mutation Research/Genetic Toxicology, v. 204, n. 2, p. 269–276, 1988.

VERRENGIA GUERRERO, N. R. et al. ***Biomphalaria glabrata*: Relevance of albino organisms as a useful tool for environmental lead monitoring.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 59, n. 5, p. 822–827, 1997.

VERSONNEN, B.; SOBANSKA, M.; CESNAITIS, R. **Ecotoxicology, Aquatic.** Encyclopedia of Toxicology: Third Edition, p. 281–283, 2014.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VITORINO, R. et al. **Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle.** Rev Soc Bras Clin Med, v. 10, n. 1, p. 39–45, 2012.

WANG, T. et al. **Plumbagin ameliorates collagen-induced arthritis by regulating Treg/Th17 cell imbalances and suppressing osteoclastogenesis.** Osteoarthritis and Cartilage, v. 25, p. S417, 2018.

WATANABE, L. C. **Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações**. In: CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z. (Eds.). *Schitosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 347–391, 2008.

WEERAKOON, K. G. A. D. et al. **Advances in the diagnosis of human schistosomiasis**. Clinical Microbiology Reviews, v. 28, n. 4, p. 939–967, 29 jul. 2015.

WEIDEBORG, M. et al. **Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 16, n. 2, p. 384–389, 1997.

WHITE, M. M.; FRIED, B.; SHERMA, J. **Effects of aestivation and starvation on the neutral lipid and phospholipid content of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*.** Journal of Parasitology, v. 93, n. 1, p. 1–3, 2007.

Yin, Z., Zhang, J., Chen, L., Guo, Q., Yang, B., Zhang, W., & Kang, W. **Anticancer Effects and Mechanisms of Action of Plumbagin: Review of Research** Advances.BioMed research international, 2020.

ZENG, X. et al. **Distribution and current infection status of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong.** Parasites and Vectors, v. 10, n. 1, 2017.

ZHANG, Q. R. et al. **Chemical constituents from aerial parts of *Plumbago zeylanica Linn***. Zhong yao cai =Journal of Chinese medicinal materials, v. 30, n. 5, p. 558–560, 2007.

ZHANG, S. M.; COULTAS, K. A. **Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis.** International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 3, n. 2013, p. 28–34, 2013a.

ZHANG, S. M.; COULTAS, K. A. **Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis.** International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 3, p. 28–34, 2013b.

ANEXO A - CARTA DE SUBMISSÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

WILZA WANESSA MELO FRANCA <wilza.franca@ufpe.br>

Manuscript submitted to Pest Management Science

1 mensagem

Pest Management Science <no-reply@atyponrex.com> 22 de dezembro de 2021 21:02
Para: Wilza França <wilza.franca@ufpe.br>

Dear Wilza França,

Your manuscript entitled "Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of plumbagin in the developmental stages of Biomphalaria glabrata (Say, 1818 - intermediate host) and cercaricidal activity against the infectious agent of schistosomiasis mansoni" has been successfully submitted online and is being delivered to the Editorial Office of *Pest Management Science* for consideration.

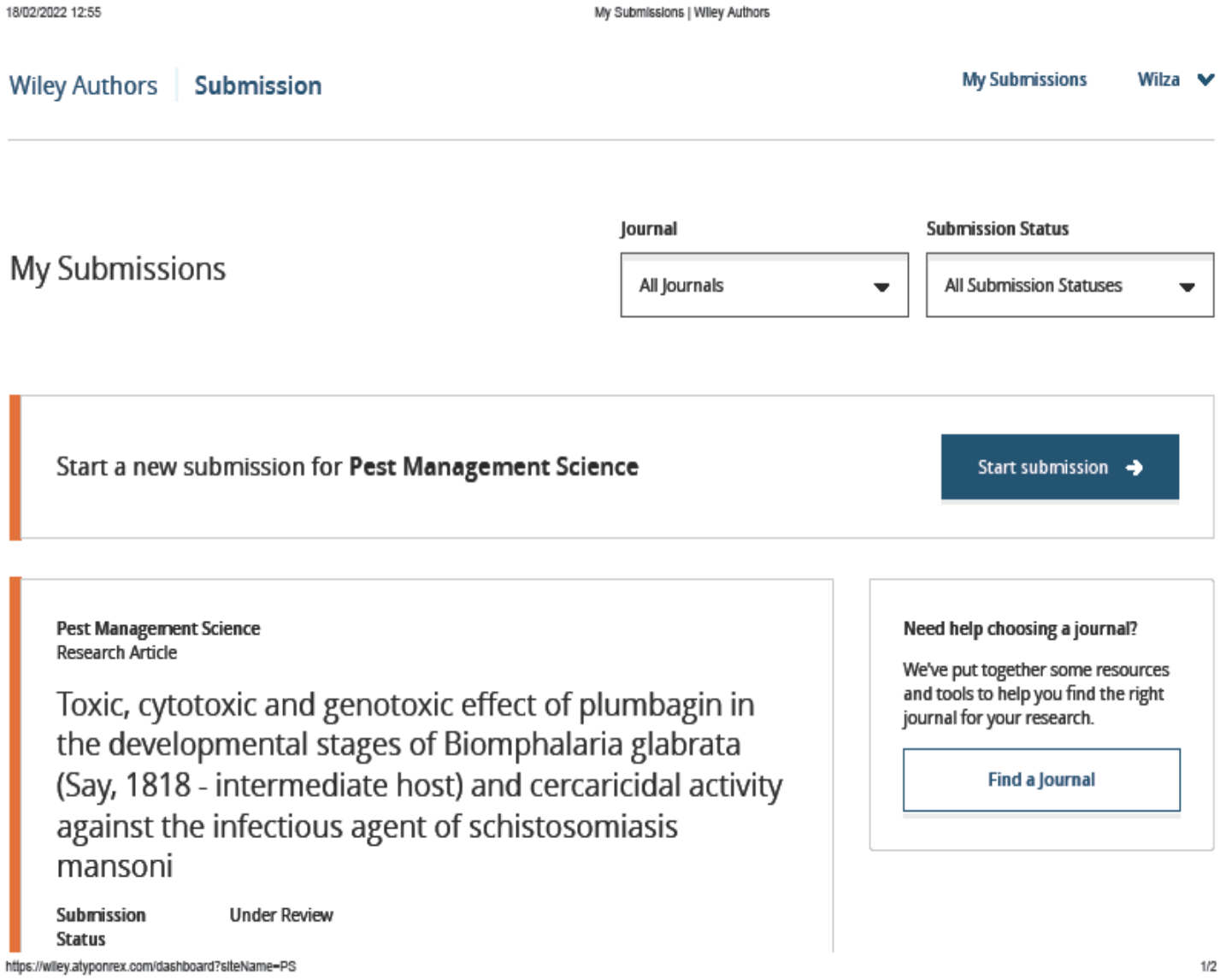
You will receive a follow-up email with further instructions from our electronic editorial office platform, ScholarOne Manuscripts, typically within one business day. That message will confirm that the Editorial Office has received your submission and will provide your Manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Pest Management Science*

Sincerely,
The Editorial Staff at Pest Management Science

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more by reading our data protection policy. **In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to** pestmansci@wiley.com.

ANEXO B - PÁGINA DE SUBMISSÃO DA PLATAFORMA DO PERIÓDICO



Manuscript ID	PM-21-1560
Submitted On	22 December 2021 by Wilza França
Submission Started	22 December 2021 by Wilza França

This submission is under consideration and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from ScholarOne.

View Submission Overview

Privacy policy | Terms & Conditions | Contact us | Help | Cookie Preferences

©Atypon Systems, LLC Atypon ReX

BETA

ANEXO C - DETALHES DO ARTIGO NA PLATAFORMA DE SUBMISSÃO

Wiley Authors | Submission My Submissions Wilza

Pest Management Science

JOURNAL HOME AUTHOR GUIDELINES EDITORIAL CONTACT Powered by Atypon ReX

Submission Overview

This manuscript has been submitted to the editorial office for review. Changes cannot be made during editorial review, but you can view the information and files you submitted, below.

Article Type	Research Article
Title	Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of plumbagin in the developmental stages of Biomphalaria glabrata (Say, 1818 - intermediate host) and cercaricidal activity against the infectious agent of schistosomiasis mansoni

Manuscript Files

Name	Type of File	Size
FRANÇA_ET_AL_2021.docx	Main Document - MS Word	80.5 KB
Figure 1.jpg	Figure	6.1 KB
Figure 2.jpg	Figure	140.4 KB
Figure 3.jpg	Figure	190 KB
Figure 4.jpg	Figure	90 KB
Figure 5.jpg	Figure	68.3 KB
Figure 6.jpg	Figure	97.3 KB
Figure 7.jpg	Figure	84 KB
Figure 8.jpg	Figure	68.3 KB
Figure 9.jpg	Figure	29.3 KB

Name	Type of File	Size
Cover_Letter_França_et_al_2021.pdf	Cover letter / Comments	176.9 KB
Graphical Abstract Text.pdf	Graphical Abstract Text	6.8 KB
Graphical Abstract Image.jpg	Graphical Abstract Image	35.4 KB

Abstract

BACKGROUND: Snails of the genus *Biomphalaria spp* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, the main etiological agent of schistosomiasis *mansoni*, which affects about 240 million people in tropical and subtropical regions of the world. Besides the treatment of the infected and adequate sanitation, the World Health Organization recommends the population control of vector snails as a strategy to reduce the prevalence and incidence of schistosomiasis. In this study, molluscicidal and antiparasitic activities of plumbagin was evaluated against the *B. glabrata* and cercariae of *S. mansoni*.
RESULTS: After 24 h of exposure, plumbagin demonstrated molluscicidal activity at low concentrations against embryos (LC90 of 0.84, 1.35, 0.96, 0.70 and 1.06 µg mL-1 for the blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage, respectively) and adult snails (LC90 of 4.34 µg mL-1). However, there were no changes in the fecundity or fertility of the exposed snails; plumbagin increased the frequency of DNA damage and hemocyte population, with apoptosis and binucleation being the main hemocyte alterations. In addition, plumbagin showed a cercaricidal effect on *S. mansoni* in concentration of 1.5 µg mL-1, while showing low toxicity to *A. salina*.
CONCLUSION: Plumbagin proved to be a promising substance for the control of *B. glabrata* population, intermediate host of *S. mansoni*, as well as the cercariae, infective stage for the man (definitive host), while being moderate toxic to *A. salina*.

Authors

Name	Email	Country/Location
Wilza Wanessa Melo França [6] Submitting Author	wilza.franca@ufpe.br	Brazil
Adriana Maria da Silva [1]	adrianams98@yahoo.com	Brazil
Emily Gabriele Marques Diniz [2]	emilygabriele1999@gmail.com	Brazil
Hianna Arely Milca Fagundes Silva [3]	hiannaamfs@gmail.com	Brazil
Dewson Rocha	dewson.rocha@g	Brazil

Pereira [3]	mail.com	
Ana Maria Mendonça Albuquerque De Melo [3]	amdemelo@hotmail.com	Brazil
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho [4]	lcbbcoelho@gmail.com	Brazil
Mônica Carnelo Pessoa de Azevedo Albuquerque [2, 5]	monica.aalbuquerque@ufpe.br	Brazil
Hallysson Douglas Andrade de Araújo [3, 4]	douglas.ufpe29@gmail.com	Brazil
André de Lima Aires [1, 5, 2] Corresponding to	andre.laires@ufpe.br	Brazil

Affiliations

1. Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.
2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil
3. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.
4. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil
5. Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil
6. 1Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco

Additional Information

Funders

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Keywords

Comet assay; Embryos; Hemocytes; Moluscicidal; Naphthoquinone

Suggested Editor

Raul Guedes

Is this submission for a special issue?

No, this is not for a special issue

Has this manuscript been submitted previously to this journal?

No, it wasn't submitted previously

Animal Subjects

There were no animal subjects

Social media mention preferences

No response provided

Do you or any of your co-authors have a conflict of interest to disclose?

No, there is no conflict of interest

Suggested Reviewers
Yasser Abobakr
yawadallah1@ksu.edu.sa
King Saud Medical City
Maíra Lima
mairavasconceloslima@gmail.com
Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociencias
Dinesh Singh
dksingh.gpu@gmail.com
Deen Dayal Upadhyay Gorakhpur University

Opposed Reviewers
No response provided

Cover Letter / Comments

Yes, I'd like to add a cover letter or comments

(see Manuscript Files)