



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ADRIANA MARIA DA SILVA

**TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE ESTÁGIOS
EMBRIONÁRIOS E CARAMUJOS ADULTOS DE
Biomphalaria glabrata, CERCÁRIAS DE *Schistosoma
mansoni* E *Artemia salina***

Recife
2023

ADRIANA MARIA DA SILVA

**TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE ESTÁGIOS
EMBRIONÁRIOS E CARAMUJOS ADULTOS DE
Biomphalaria glabrata, CERCÁRIAS DE *Schistosoma
mansoni* E *Artemia salina***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. André de Lima
Aires

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Adriana Maria da.

Toxicidade da plumbagina sobre os estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina* / Adriana Maria da Silva. - Recife, 2023.

108 : il., tab.

Orientador(a): André de Lima Aires

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Citotoxicidade. 2. Embriotoxicidade. 3. Esquistossomose. 4. Moluscicida. 5. Naftoquinona. I. Aires, André de Lima. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

ADRIANA MARIA DA SILVA

**TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE ESTÁGIOS
EMBRIONÁRIOS E CARAMUJOS ADULTOS DE
Biomphalaria glabrata, CERCÁRIAS DE *Schistosoma
mansoni* E *Artemia salina***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito
à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Aprovada em: 27/04/2023

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

ANDRE DE LIMA AIRES

Data: 05/06/2023 15:34:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires
UFPE / Departamento de Medicina Tropical



Documento assinado digitalmente

HALLYSSON DOUGLAS ANDRADE DE ARAU

Data: 05/06/2023 12:34:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo
UFPE / Departamento de Bioquímica



Documento assinado digitalmente

JOAO VICTOR RITINTO DA ROCHA

Data: 05/06/2023 15:20:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestre João Victor Ritinto da Rocha
UFPE / Instituto Keizo Asami

Dedico este trabalho a minha família
que é minha força e nunca me
permitiram desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me permitido chegar até aqui, por ter me dado a força e ter sido minha bússola quando me perdi no decorrer dessa longa trajetória, além de ter me abençoado com a minha família, que são minha luz e motivação para seguir.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Aires por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, por toda paciência, pelo incentivo acadêmico, por todas orientações e conhecimentos que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À Hallysson Douglas, por toda orientação, conselhos e por todo incentivo no decorrer dessa trajetória, por manter meu foco no decorrer das experimentações. Aos colegas de laboratório, em especial Wilza França e Emily Marques, por todas contribuições, ensinamentos e tornarem o ambiente de trabalho mais alegre.

À minha mãe Alcione Silva, por todo amor incondicional e compreensão, por ser minha âncora, por sempre me manter centrada, por ser o principal motivo da minha persistência e por estar sempre ao meu lado, nos melhores e piores dias.

Aos meus irmãos Mayara Silva e Davi Renan, por todos os momentos, por todo companheirismo e parceria, por me fortalecerem, por me tornarem uma pessoa melhor.

À minha vó Creuza Silva, por todo amor incondicional, por ser minha fortaleza e bússola, por ser responsável pelas melhores memórias da minha infância, por perdoar toda a minha ausência devido a demandas acadêmicas, nem imagino o quanto deve ter machucado.

À toda minha família, por encherem meu coração de alegria, por todos os almoços na casa de vovó, por tornarem a minha vida mais leve.

Ao meu namorado, Matheus Costa por todo amor, cuidado, paciência e por todas as vezes que me alegrou e iluminou os meus dias escurecidos com sua leveza e simplicidade de ver a vida.

À Luninha e Lua, por alegrarem meus dias com um miado ou apenas uma foto.

Aos meus queridos amigos, Emily Marques, Henrique Fernando, Jean Víctor e Vitória Julyana, por serem minha rede de apoio, por compartilharem comigo os melhores e piores momentos da graduação. Vocês tornaram a jornada acadêmica mais prazerosa.

À todos os professores da graduação em biomedicina, por todos ensinamentos nos anos de curso, especialmente Prof. Dr Marcos André, Prof. Dr. Antônio Roberto e Prof^a. Dr^a. Rosangela Frade por fazerem meu amor pela biomedicina renascer e não ter desistido do curso.

Aos preceptores do Hospital das Clínicas - UFPE, por todo acolhimento e ensinamentos, por terem me proporcionado o melhor estágio curricular que eu poderia ter.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao iLIKA, à PROPESQi e CNPq, por me proporcionarem a oportunidade de percorrer minha trajetória científica.

SILVA, Adriana Maria da. **Toxicidade da plumbagina sobre estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina***. 2023. 108 págs. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária negligenciada que afeta cerca de 250 milhões de pessoas, sendo prevalente em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades com péssimas condições socioeconômicas. *Biomphalaria glabrata* encontra-se na faixa litorânea brasileira e é hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose. Uma das formas de combater a esquistossomose é através do controle populacional da *B. glabrata*, neste sentido as substâncias naturais e/ou seus derivados tem sido exploradas como alternativas a niclosamida, porque o esse comoposto químico recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), além do alto custo é tóxico para o meio ambiente. Neste contexto, as naftoquinonas representam uma ampla família de metabólitos naturais já conhecidos e de grande interesse para a indústria farmacêutica, com promissora atividade antiparasitária. Nesse grupo destacamos a plumbagina por apresentar amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas, além do seu potencial antiparasitário. A pesquisa teve como objetivo avaliar toxicidade da plumbagina sobre diferentes estágios embrionários e caramujos adultos da *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina* (bioindicador). Para os ensaios biológicos, embriões (n=100) nos estágios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage* foram expostos durante 24 h a diferentes concentrações de plumbagina. Após a exposição os embriões foram lavados e transferidos para placas limpas com água, monitorados por 7 dias para observar os parâmetros de viabilidade e inviabilidade (mortos e mal formados). Caramujos adultos medindo 10-14 mm de diâmetro de concha, foram expostos a plumbagina durante 24 h e observados por 7 dias, sendo registradas as taxas de mortalidade, fecundidade e fertilidade. Para análises da ação citotóxica e genotóxica foram realizados ensaio cometa, micronúcleo e outras anomalias celulares. Para o ensaio cercaricida, com cercárias foram expostas a plumbagina e avaliadas de acordo com escores de motilidade. Para avaliação da ecotoxicidade da plumbagina foram realizados ensaios com *A. salina*. Os náuplios (n=10) foram expostos a plumbagina, dissolvida em água do mar em diferentes concentrações por 24 h. Em todos os experimentos a niclosamida foi utilizada como controle positivo e para os controles negativos, água e DMSO. Após 24 h de exposição, a plumbagina demonstrou atividade moluscicida em baixas concentrações contra embriões (causou 50% de inviabilidade nas concentrações de 0,56, 0,93, 0,68, 0,51 e 0,74 µg/mL nos estágios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage*, respectivamente) e nos caramujos adultos a letalidade de 50% foi alcançada na concentração de 3,56 µg/mL. Não houve mudanças na fecundidade e fertilidade dos caramujos expostos; no entanto, a plumbagina foi capaz de aumentar a frequência de dano ao DNA e anomalias nucleares nos hemócitos, sendo a apoptose e a binucleação as principais alterações. Além disso, a plumbagina causou morte de cercárias de *S. mansoni* na concentração de 1,5 µg/mL em 60 min e demonstrou toxicidade moderada para *A. salina*. A plumbagina mostrou ser uma substância

promissora para o controle da população de *B. glabrata*, hospedeiro intermediário de *S. mansoni*, assim como as cercárias, estágio infectivo para humanos (hospedeiro definitivo), sendo moderadamente tóxico para *A. salina*, um crustáceo amplamente utilizado em testes de ecotoxicidade.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Embriotoxicidade. Esquistossomose. Moluscicida. Naftoquinona.

SILVA, Adriana Maria da. **Toxicity of plumbagin on embryonic and adult snails of *Biomphalaria glabrata*, cercariae of *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*.** 2023. 108 pags. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected infectious-parasitic disease that affects about 250 million people, prevalent in 78 countries and territories in tropical and subtropical regions, mainly in communities with terrible socioeconomic conditions. *Biomphalaria glabrata* is found along the Brazilian coastline and is an intermediate host and vector of *Schistosoma mansoni*, the etiologic agent of schistosomiasis. One of the ways to combat schistosomiasis is through population control of *B. glabrata*, in this aspect natural substances and/or their derivatives are being researched as an alternative, because niclosamide, chemical products recommended by the World Health Organization (WHO), in addition to high cost is toxic to the environment. In this context, naphthoquinones represent a wide family of natural metabolites already known and of great interest to the pharmaceutical industry, with promising antiparasitic activity. In this group, we highlight plumbagin for presenting a wide spectrum of biological and pharmacological properties, in addition to its antiparasitic potential. The research aimed to evaluate the toxicity of plumbagin on different embryonic possibilities and adult snails of *Biomphalaria glabrata*, cercariae of *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina* (bioindicator). For the biological assays, embryos (n=100) in the blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage were exposed for 24 h to different concentrations of plumbagin. After exposure, the embryos were washed and transferred to clean plates with water, monitored for 7 days to observe the parameters of viability and non-viability. Adult snails measuring 10-14 mm shell diameter were exposed to plumbagin for 24 h and observed for 7 days, recording mortality, fecundity and fertility rates. For analyzes of the cytotoxic and genotoxic action, comet, micronucleus and other cellular anomalies assays were performed. For the cercaricidal assay, one hundred cercariae were exposed to plumbagin and the motility score was used for evaluation. To evaluate the ecotoxicity of plumbagin, tests were carried out with *A. salina*. The nauplii (n=10) were exposed to plumbagin, dissolved in seawater at different concentrations for 24 h. In all experiments, niclosamide was used for positive controls and water + DMSO for negative controls. After 24 h of exposure, plumbagin showed molluscicidal activity at concentrated concentrations against embryos (caused 50% non-viability at concentrations of 0.56, 0.93, 0.68, 0.51 and 0.74 µg/mL in increase in blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage, respectively) and in adult snails the lethality of 50% was reached at a concentration of 3.56µg/mL. There were no changes in fecundity and fertility of exposed snails; however, a plumbagin was able to increase the frequency of DNA damage and the number of hemocytes, with apoptosis and binucleation being the main alterations. In addition, a plumbagin that causes the death of cercariae in *S. mansoni* at a concentration of 1.5 µg/mL in 60 min and tested for toxicity to *A. salina*. Plumbagin proved to be a promising substance for controlling the population of *B. glabrata*, intermediate host of *S. mansoni*, as well as cercariae, infectious stage for humans (definitive host), being moderately toxic for *A. salina*, a widely used crustacean in ecotoxicity tests.

Key words: Cytotoxicity. Embryotoxicity. Molluscicidal. Naphthoquinone. Schistosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência da esquistossomose no mundo.....	18
Figura 2: Distribuição global das espécies do gênero <i>Schistosoma</i> spp.	19
Figura 3: Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2010.	20
Figura 4: Taxa de mortalidade por esquistossomose segundo estados brasileiros (2015 - 2019).	21
Figura 5: Número de exames coproscópicos, número de casos positivos e percentual de positividade por esquistossomose em Pernambuco de 2010 a 2019.	22
Figura 6: Distribuição espacial dos municípios de Pernambuco com trabalho para esquistossomose (1) e municípios prioritários (2) segundo as Gerências Regionais de Saúde (GERES) em 2019.	23
Figura 7: Ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 8: Miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 9: Cercária de <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 10: Esquistossômulo de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 11: Casal de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	28
Figura 12: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 13: Granulomas induzidos por ovos de <i>S. mansoni</i> no fígado de um rato infectado.	32
Figura 14: Distribuição global de espécies suscetíveis de <i>Biomphalaria</i> spp.	35
Figura 15: Distribuição espacial no Brasil das espécies de <i>B. glabrata</i> (A), <i>B. straminea</i> (B) e <i>B. tenagophila</i> (C).	36
Figura 16: <i>Biomphalaria glabrata</i> , principal hospedeiro intermediário do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil.	38
Figura 17: Estágio embrionário da <i>Biomphalaria glabrata</i> . Blástula (A), Gástrula (B), Trocófora (C), Véliger (D) e Hippo stage (E).	39
Figura 18: Representação da estrutura química do Praziquantel.	42
Figura 19: Representação da estrutura química da Plumbagina.	50
Figura 20: Toxicidade da plumbagina sobre os estágios embrionários da <i>B. glabrata</i>	61
Figura 21: Embriões de <i>B. glabrata</i> expostos à água (controle negativo), à niclosamida (controle positivo) e à plumbagina.	62

Figura 22: Toxicidade da plumbagina sobre caramujos adultos de <i>B. glabrata</i> durante 8 dias após exposição.	64
Figura 23: Embriões depositados pelos caramujos nos 8 dias de observação após a exposição à plumbagina.	65
Figura 24: Hemócitos de <i>B. glabrata</i> após exposição à plumbagina.	66
Figura 25: Análise das alterações morfológicas em hemócitos (1000 cels) de <i>B. glabrata</i> exposto a diferentes concentrações da plumbagina.	67
Figura 26: Avaliação do grau de dano ao DNA de células da espécie <i>B. glabrata</i> após exposição a plumbagina.	68
Figura 27: Danos ao DNA de hemócitos de <i>B. glabrata</i> determinados pelo ensaio cometa.	69
Figura 28: Cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> , controle negativo (A), controle positivo (B) e plumbagina (C).	71
Figura 29: Sobrevivência do bioindicador ambiental <i>Artemia salina</i> após exposição a plumbagina.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ação da plumbagina sobre cercárias de <i>S. mansoni</i> por tempo de exposição em minutos.	70
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ANOVA	Análise de variância
BH	Belo Horizonte
CCl ₄	Tetracloreto de Carbono
CG	Canal Ginecóforo
CL	Concentração Letal
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter Spp</i>
GERES	Gerências Regionais de Saúde
hab	Habitantes
ID	Índice de dano
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MMS	Metanossulfonato de metila
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NaCl	Cloreto de sódio
NCL	Niclosamida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PZQ	Praziquantel

SES-PE Secretaria Estadual de Saúde – Pernambuco
SmTGR Inibidores da tioredoxina-glutationa redutase
Tb Terebratorium
TGF- β Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
TryR Tripanotiona redutase
WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 ESQUISTOSSOMOSE: CONCEITO E HISTÓRICO.....	16
2.2 EPIDEMIOLOGIA	17
2.3 ASPECTOS GERAIS DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	23
2.3.1 Formas Evolutivas do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
2.3.2 Ciclo Biológico.....	28
2.4 FISIOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	30
2.5 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS	34
2.5.1 Distribuição Geográfica.....	34
2.5.2 Aspectos gerais do Gênero <i>Biomphalaria</i>	37
2.6 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE	40
2.6.1 Tratamento quimioterápico e praziquantel	41
2.6.2 Controle de Vetores.....	43
2.7 PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVAS MOLUSCICIDAS	44
2.7.1 Bioindicador: <i>Artemia salina</i>	46
2.8 NAFTOQUINONAS	47
2.8.1 Plumbagina.....	49
3 OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 METODOLOGIA	54
4.1 DROGAS E PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DA PLUMBAGINA EM EMBRIÕES DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> E <i>ARTEMIA SALINA</i>	54
4.2 MANUTENÇÃO E OBTENÇÃO DE CARAMUJOS <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> E DA CEPA DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	54
4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	55
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CARAMUJOS ADULTOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	55
4.5 ANÁLISES DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ANOMALIAS NUCLEARES NOS HEMÓCITOS DE CARAMUJOS ADULTOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> EXPOSTOS A PLUMBAGIN.	56
4.6 ENSAIO COMETA	56

4.6.1	Análise por microscopia de fluorescência	57
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	58
4.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AMBIENTAL DA PLUMBAGINA SOBRE <i>ARTEMIA SALINA</i> . 58	
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	60
5.2	TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS CARAMUJOS ADULTOS DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	63
5.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE FECUNDIDADE E FERTILIDADE DOS CARAMUJOS ADULTOS EXPOSTOS A PLUMBAGIN.	64
5.4	ANÁLISE QUANTITATIVA DE APOPTOSE, BINUCLEAÇÃO E MICRONÚCLEOS NOS HEMÓCITOS.	65
5.5	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ALTERAÇÕES NO DNA POR MEIO DE ENSAIO COMETA.	68
5.6	TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	70
5.7	ANÁLISE DA TOXICIDADE AMBIENTAL DA PLUMBAGINA SOBRE O BIOINDICADOR, <i>ARTEMIA SALINA</i>	72
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICES – ARTIGO	89
	ANEXOS – NORMAS DA REVISTA - PEST MANAGEMENT SCIENCE	102

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária negligenciada, prevalente em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades mais pobres sem acesso a saneamento básico ou água potável, além de fatores genéticos e imunológicos que influenciam a suscetibilidade à infecção. (CARDOSO et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2012. WHO 2023). Estima-se mais de 250 milhões de pessoas infectadas no ano de 2021, das quais apenas 75,3 milhões realizaram o tratamento contra esquistossomose (WHO, 2023). A taxa de mortalidade para esquistossomose é difícil de avaliar, estima-se anualmente 11 mil mortes causadas no mundo, contudo esse dado pode ser inferior a realidade, existe muitos casos subnotificados (WHO, 2023).

No Brasil estima-se que 43 milhões de pessoas estão sujeitas à infecção e que existam 2,5 milhões de infectados, contudo esses dados podem não ser condizentes com a realidade porque os inquéritos epidemiológicos fazem apenas uma cobertura parcial. A faixa endêmica se inicia no Maranhão, prolongando-se até Minas Gerais, sendo 80% dos casos na região Nordeste (KATZ, 2018). O estado de Pernambuco ocupa o terceiro lugar em no número de casos de esquistossomose, sendo prevalente em 102 (55%) de seus municípios. Destes, 12% dos casos se concentram na região metropolitana do Recife, caracterizando um grave problema de saúde pública devido a sua alta prevalência e gravidade nos desfechos clínicos. Pernambuco apresenta elevada taxa de internação hospitalar e a maior taxa de mortalidade por esquistossomose, uma média cinco vezes superior à nacional (OLIVEIRA et al., 2018; SOARES et al., 2019; SOUSA et al., 2021)

Os helmintos do gênero *Schistosoma* são os agentes etiológicos da esquistossomose, no Brasil a espécie responsável pelos casos da doença é o *Schistosoma mansoni*. A infecção é potencialmente fatal e sua patogenia está associada com a resposta imunológica que resulta no comprometimento hepatoesplênico e intestinal, que ocorrem devido a inflamação granulomatosa, hipertensão portal, alterações hemodinâmicas e bioquímicas no fígado, baço e intestino (STRICKLAND, 2001; McMANUS et al, 2020). A transmissão do *S. mansoni*

depende do contato humano com coleções hídricas onde habitam caramujos infectados, que diariamente liberam milhares de cercárias, forma infecciosa para o homem, hospedeiro definitivo. Estes caramujos são hospedeiros intermediários e no Brasil encontramos as seguintes espécies: *Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata* (CARVALHO et al., 2008), sendo esta última o principal vetor, especialmente na Região Nordeste e grande disseminação no Litoral pernambucano. Em Pernambuco, existem áreas em que a positividade para caramujos *B. glabrata* eliminando cercárias de *S. mansoni* chega a cerca de 80% (BARBOSA et al., 2014; LOYO; BARBOSA, 2016; GANDASEGUI et al., 2018).

Na ausência de vacina biossegura e medidas políticas sanitárias efetivas, o controle e prevenção da esquistossomose é uma das tarefas difíceis para os serviços de saúde. Uma das estratégias empregadas é o tratamento com Praziquantel (PZQ), única droga com atividade esquistossomicida apenas contra vermes adultos de *S. mansoni*, utilizada há mais de 50 anos. No entanto, o número de tratamento disponibilizado não atende a demanda de casos nos serviços públicos de saúde, além dos inúmeros casos de reinfecção e relatos de tolerância e/ou resistência do *S. mansoni* frente ao PZQ (CRIBB et al., 2019; McMANUS et al., 2020; TEDLA et al., 2020). Dessa forma, pesquisas são realizadas buscando novas drogas para controle, prevenção e tratamento da esquistossomose.

Outra estratégia empregada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é o controle populacional dos hospedeiros intermediários através do uso de moluscidas, substâncias usadas para controlar/exterminar moluscos de importância econômica na agronomia e também no controle de caramujos vetores de parasitos com importância médica humana, como no caso dos vetores de *S. mansoni* (ARAÚJO et al., 2018a, b, c, d; SANTOS et al., 2020). A niclosamida (Bayluscide, Bayer®) já demonstrou ser mais efetivo que outros moluscidas inorgânicos ou sintéticos, porém a niclosamida apresenta baixa seletividade biocida, elevado custo para aplicação e dificuldade no transporte (CARVALHO et al., 2008).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são amplamente distribuídos, hermafroditas e apresentam inúmeros mecanismos imunes de escapes e alta capacidade reprodutiva (CARVALHO et al., 2008). Dessa forma, o controle populacional dos moluscos vetores é de extrema importância para redução da transmissão do *S. mansoni*, devido à redução da população de caramujos vetores e

consequentemente a interrupção do contato humano com cercárias de *S. mansoni*. Assim, existe uma urgente necessidade de investimento em pesquisas que possam contribuir com novas alternativas moluscidas com ação eficaz, biossegura, seletiva, baixo custo e de fácil aplicação (MARTINS et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018a; SILVA et al., 2019; MOLOO, 2020). Este cenário encoraja nosso grupo de pesquisa na busca por produtos naturais e seminaturais bioativos no controle populacional dos hospedeiros intermediários e que não apresentem toxicidade significativa para o meio ambiente.

Neste cenário, as naftoquinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos naturais já conhecidos e de grande interesse para a indústria farmacêutica. As naftoquinonas se destacam como promissores agentes antiparasitários contra *Paramphistom//um cervi* (SAOWAKON et al., 2013), *Trypanosoma cruzi* (FERREIRA et al., 2011), *Plasmodium spp* (PÉREZ-SACAU et al., 2005), *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2013), *Toxoplasma gondii* (FERREIRA et al., 2012), *Giardia lamblia* (CORRÊA et al., 2009), *Fasciola gigantica* (LORSUWANNARAT et al., 2013) e *S. mansoni* (ZHANG; COUTLAS, 2013; AIRES et al., 2014a, b; LORSUWANNARAT et al., 2014). Além disso, derivados de naftoquinonas são ativos contra embriões e moluscos adultos de *B. glabrata* (LIMA et al., 2002; CAMARA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009). Ademais, foi avaliada a ação tópica dos derivados naftoquinônicos e observaram que 15 naftoquinonas bloquearam a penetração das cercárias, quando aplicadas nas caudas dos camundongos 24 h antes da exposição (PINTO et al., 1977).

A naftoquinona plumbagina (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone), isolada das raízes da planta medicinal *Plumbago zeylanica* L. é amplamente distribuída na família Plumbaginaceae. Apresenta amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas incluindo ativação da apoptose, antioxidante, antiinflamatório, anti-cancerígeno, antibacteriano e antifúngico (PAIVA et al., 2003; TSAO et al., 2020) e na modulação positiva na hepatite fulminante (PADADHYE et al., 2012; WANG et al., 2016), na fibrose induzida por CCl 4 (CHEN et al., 2015) e na capilarização dos sinusóides hepáticos (LI et al., 2017). E assim como outras naftoquinonas a plumbagina apresenta efeitos farmacobiológicos por alquilação de proteínas e/ou DNA e desequilíbrio oxi-redox produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS) (HAKURA et al., 1994; SHANG et al., 2012; TSAO et al., 2020). Assim, o objetivo é avaliar a

toxicidade da plumbagina sobre diferentes estágios embrionários (blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage*) e caramujos adultos da *B. glabrata*, visando analisar os efeitos citotóxico e genotóxico sobre os hemócitos do mesmo molusco, ação cercaricida contra o agente etiológico da esquistossomose, além de avaliar a toxicidade sobre *Artemia salina* (bioindicador de toxicidade ambiental).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESQUISTOSSOMOSE: CONCEITO E HISTÓRICO

Esquistossomose, bilharziose ou barriga d'água, como é popularmente conhecida é uma doença negligência que pode se manifestar de forma aguda ou crônica e apresenta etiologia infecciosa causada pela presença um par adultos de parasitas trematódeo do gênero *Schistosoma* na vascularização venosa do hospedeiro (McMANUS 2018). A esquistossomose afeta mais de 250 milhões de pessoas no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais com péssimas condições socioeconômicas, saneamento básico e água potável (COLLEY et al., 2014; DEJON-AGOBÉ et al., 2022).

A infecção ocorre após o humano ter contato com água contaminada por cercárias que foram liberadas por caramujos do gênero *Biomphalaria*. Atualmente se conhece 6 espécies que podem infectar os caramujos vetores da esquistossomose, contudo 3 espécies são mais preocupantes. No continente Africano e Oriente médio as espécies *Schistosoma haematobium* e *S. mansoni* são prevalentes, *S. japonicum* na Ásia, já no continente Americano a espécie *S. mansoni* é o principal agente etiológico. Os danos fisiopatológicos dessa infecção são resultados da resposta inflamatória granulomatosa com comprometimento hepatoesplênico, intestinal e urinário (COLLEY et al., 2014; LEWIS; TUCKER, 2014; LO et al., 2022).

No ano de 1852 o médico Theodor Bilharz, descreveu pela primeira vez o parasito ao realizar uma autópsia humana e o chamou de *Distomum haematobium*, por apresentar duas ventosas e habitar vasos sanguíneos, a doença foi denominada de bilharziose. Só no ano de 1907, após analisar fezes, o pesquisador Sambon nomeou a espécie *Schistosoma mansoni*, em homenagem a Patrick Manson, pai da medicina tropical. Em 1908, o médico Manoel Pirajá da Silva, no estado da Bahia, descreveu ovos com espículo lateral ao realizar análise de amostras fecais e vermes em autópsias denominando-o de *Schistosoma americanum*. Em 1915, Robert Leiper descreve o ciclo evolutivo baseado no trabalho de cientistas japoneses, que explicaram o ciclo do *S. japonicum*. No Brasil, Lutz estabelece que são os hospedeiros

intermediários e o ciclo do *S. mansoni* (KATZ; ALMEIDA, 2003; PRATA, 2008; NEVES, 2016; KATZ, 2018).

Uma das formas de introdução da parasitose no Brasil é através do tráfico de escravos africanos, maioria das pessoas escravizadas estavam infectados pelo *S. mansoni* e *S. haematobium*. Apenas a espécie *S. mansoni* obteve sucesso no país por causa da presença do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, bem como os péssimos hábitos de higiene e ausência de saneamento básico, dentre outros fatores. Por volta de 1950 iniciou a realização de inquéritos coprológicos nas escolas e 2.5 milhões de pessoas positivaram, com a presença de ovos de *S. mansoni* nas amostras fecais (KATZ; ALMEIDA, 2003; PRATA, 2008; KATZ 2018).

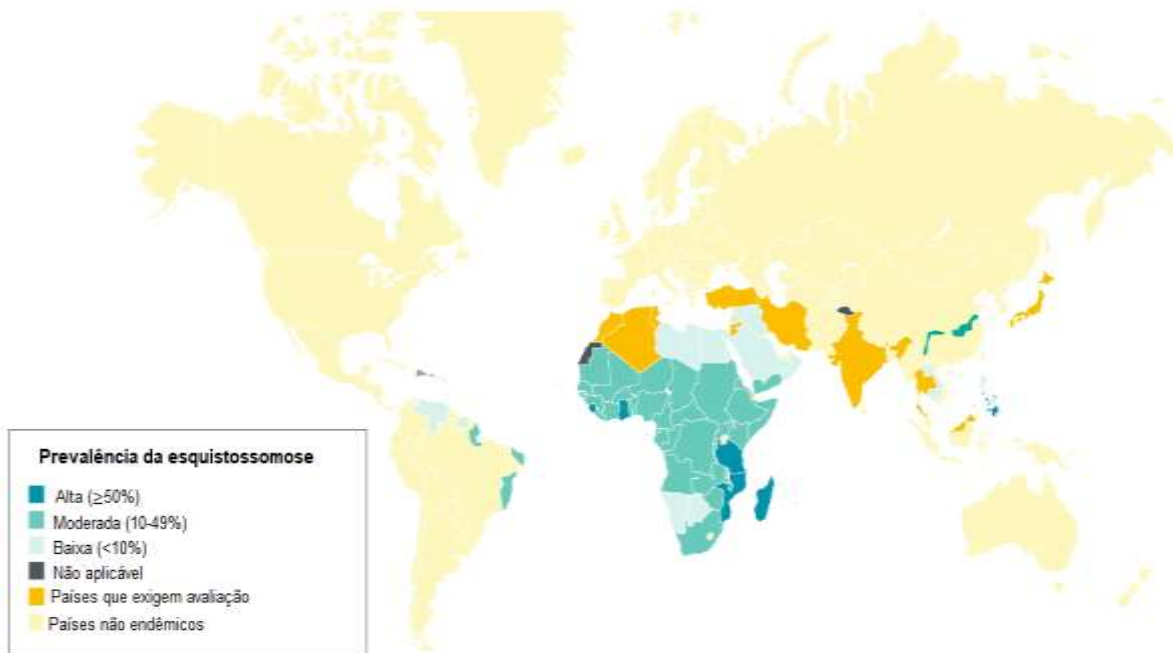
A parasitose foi rapidamente disseminada no país, em 1960 estima-se que mais de 6 milhões de pessoas foram infectadas. Para controlar a situação, em 1975 é criado o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) pelo Ministério da Saúde, no qual milhões de pessoas receberam tratamento, aplicação de moluscidas, conscientização da população e avanços no tratamento de água e esgoto, principalmente em Minas Gerais e Região Nordeste, áreas endêmicas para esquistossomose. Os casos iniciais predominaram na região canavieira nordestina e com os movimentos migratórios devido ao ciclo do ouro, ciclo da borracha, ciclo do café e industrialização, resultou na disseminação da esquistossomose para todo o país (PRATA, 2008; NEVES, 2016; KATZ, 2018).

2. 2 EPIDEMIOLOGIA

A esquistossomose é uma doença negligenciada reportada em 78 países, sendo endêmica a 51 territórios de regiões tropicais e subtropicais com baixas condições socioeconômicas e precário e/ou ausente saneamento básico. Atualmente, a esquistossomose afeta cerca de 250 milhões e mais de 700 milhões de pessoas no mundo vivem em regiões endêmicas. A prevalência de casos como é demonstrada na Figura 1 se concentra na África Subsaariana, outros focos estão localizados na Ásia, América Latina e Oriente Médio, um dos fatores determinantes são localidades onde populações possuem níveis mais altos de desigualdade social e deficiências nos

serviços de saúde detêm a doença mais predominantemente. Em 2021, mais de 251 milhões de pessoas necessitavam de tratamento e apenas 75 milhões foram devidamente tratadas (LO et al., 2022; WHO, 2023).

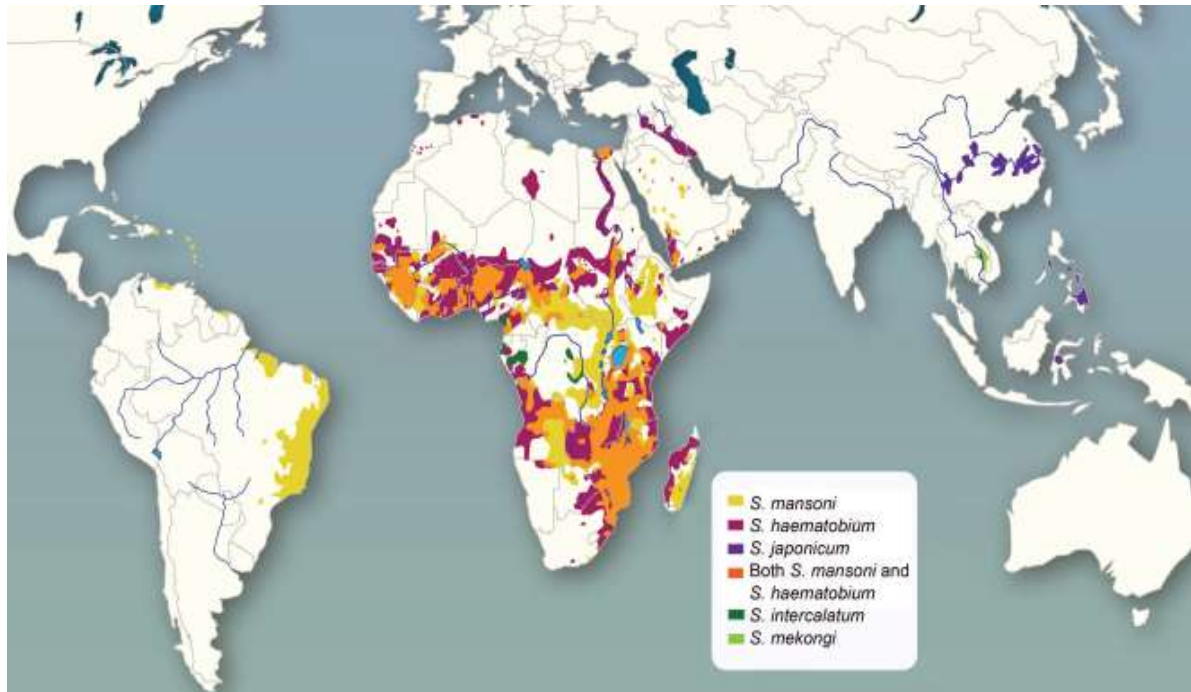
Figura 1: Prevalência da esquistossomose no mundo.



Fonte: McMANUS et al., 2018.

São 6 as espécies de *Schistosoma* spp., responsáveis por infectar humanos e que se distribuem diferentemente pelo mundo. O *S. haematobium* foi encontrado em 54 países, sendo a espécie predominante na África subsaariana e Oriente Médio. O *S. mansoni* apresenta ampla distribuição, sendo localizado na África subsaariana, Índia, América Central e do Sul, sendo essa a espécie predominante no Brasil. O *S. japonicum* é endêmico na China, Indonésia, Filipinas e até 1970, no Japão, mas devido a políticas de controle do hospedeiro intermediário e tratamento dos infectados resultaram na eliminação. As espécies *S. intercalatum* e *S. guineensis* possuem menor prevalência, são endêmicas na África ocidental e central. Outra espécie de baixa incidência é o *S. mekongi*, de importância local na região da Bacia do Rio Mekong (WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2018) (Figura 2).

Figura 2: Distribuição global das espécies do gênero *Schistosoma* spp.



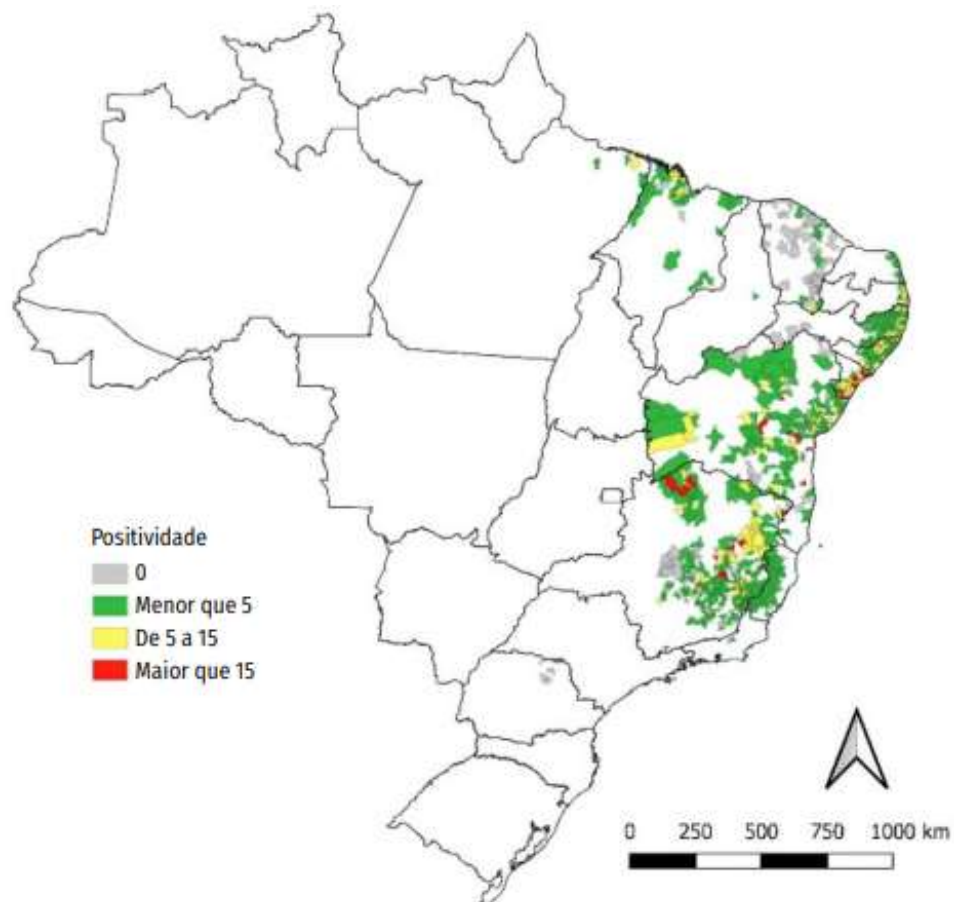
Fonte: WEERAKOON et al., 2015.

No Brasil, o agente etiológico é o *S. mansoni*, o primeiro levantamento epidemiológico foi realizado entre 1947 e 1950, logo em seguida a doença foi incluída na pauta das políticas públicas. A esquistossomose apresenta ampla extensão e consequências, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública, cerca de 43 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção e 2,5 milhões infectadas (ROCHA, 2016; KATZ, 2018; SILVA et al., 2022).

O Brasil é responsável pela maior área endêmica do continente americano, a expansão da esquistossomose no país ocorreu por meio da migração de moradores de regiões endêmicas e possivelmente infectados pelo *S. mansoni*, em busca de melhores condições de vida. Ao migrarem, formam pequenos povoados com péssimas condições sanitárias e de higiene pessoal, favorecendo a dispersão da doença. A faixa endêmica no país é composta por 19 estados (Figura 3), abrangendo os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. A transmissão em áreas menores ocorre nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal, conforme pode ser observado na Figura

3. No intervalo de 2009 a 2019 aproximadamente 423.117 casos foram confirmados no país, apresentando um percentual de positividade de 4,29% (BRASIL, 2021; SILVA et al., 2022).

Figura 3: Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2010.

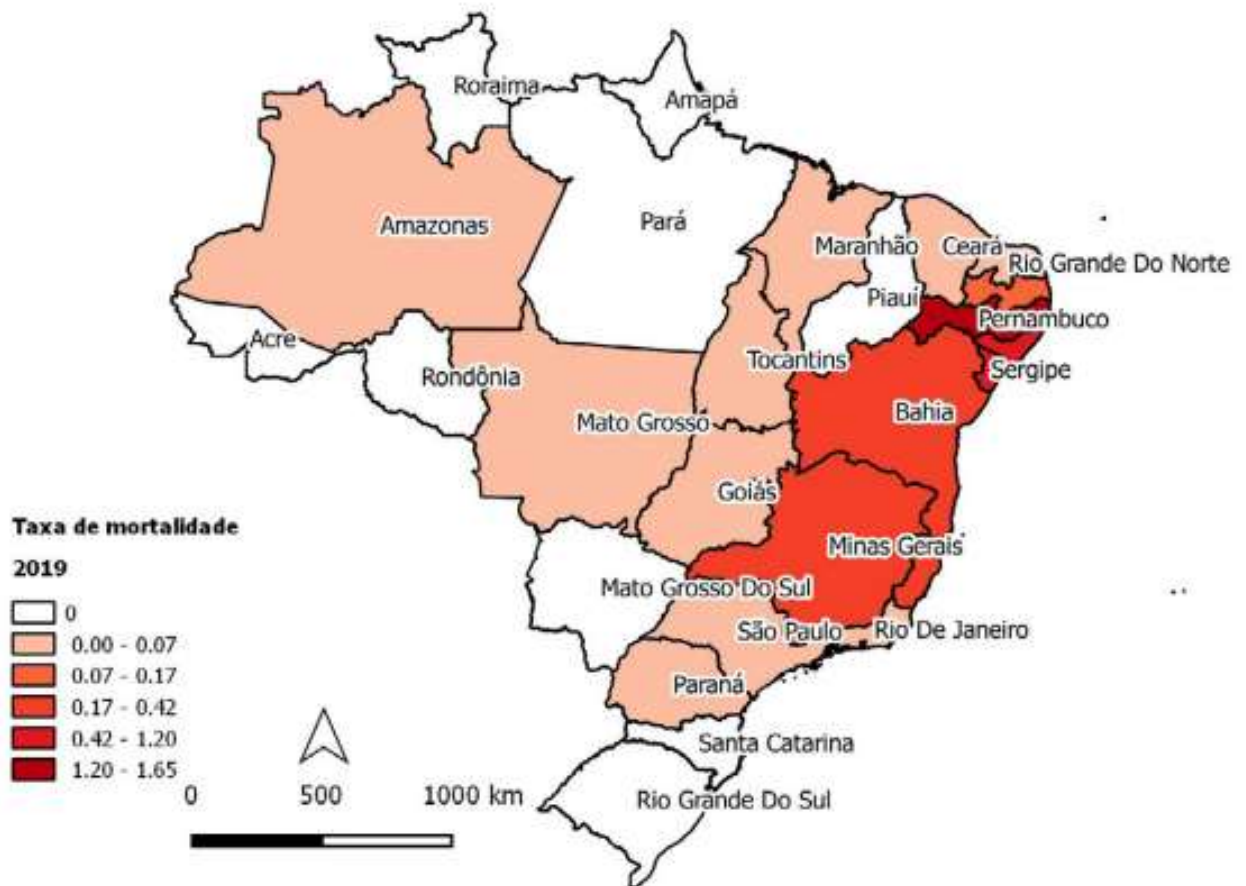


Fonte: BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - BRASIL, 2021.

De 2015 a 2019, no Brasil houve 2.517 mortes por esquistossomose, a taxa de mortalidade no país aumentou para 0,26/100.000 habitantes no ano de 2018 e no ano seguinte foi reduzida para 0,22/100.000 hab. O Nordeste brasileiro apresenta as maiores taxas de mortalidade (em 2019: 0,53/100.000 hab), taxa 3 vezes maior que a da Região Sul (Figura 4). Os estados com maiores taxas de positividade do País ficam da Região Nordeste: Pernambuco (1,75/100.000 hab), Alagoas (1,70/100.000 hab),

Sergipe (1,03/100.000 hab), Bahia (0,43/100.000 hab) e Minas Gerais (0,38/100.000 hab) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Figura 4: Taxa de mortalidade por esquistossomose segundo estados brasileiros (2015 - 2019).



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, 2022.

Historicamente Pernambuco é uma área endêmica para esquistossomose, sendo o estado brasileiro com maior endemicidade, responsável por aproximadamente 1/3 das mortes e apresenta uma série histórica (1979- 2010) de taxa de mortalidade cinco vezes maior que a taxa média nacional (Figura 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

No período de 2010 a 2019 o estado apresentou 101 municípios caracterizados como endêmicos. Nesse intervalo a Vigilância da esquistossomose de Pernambuco executou cerca de 1,5 milhão de exames coproscópicos, sendo 60.380 positivos para a parasitose e apenas 46.383 realizaram o tratamento. Pernambuco é o estado que

apresenta mais casos graves e com maior taxa de mortalidade, só no ano de 2019 foram registrados 164 mortes por esquistossomose. Apesar das elevadas taxas que o estado apresenta quando comparado a outros do país, o número de casos positivos vem diminuindo, com redução de aproximadamente 74,7% (Figura 5) (PERNAMBUCO, 2019; SES - PE, 2021).

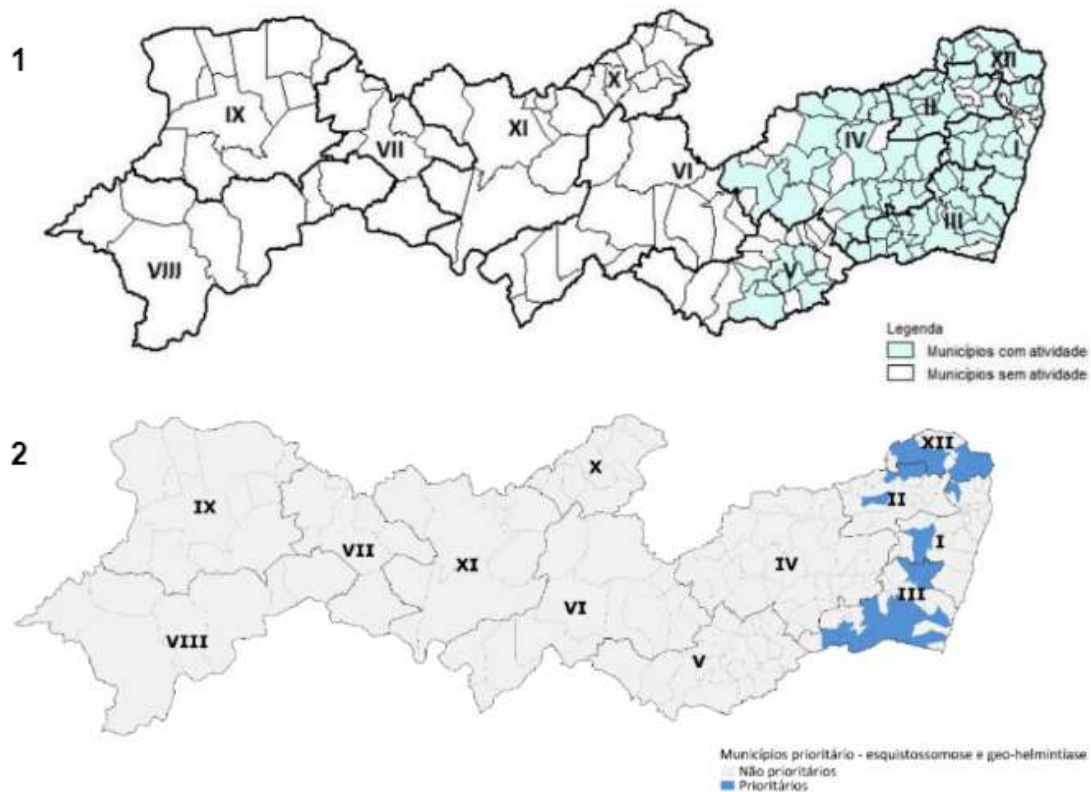
Figura 5: Número de exames coproscópicos, número de casos positivos e percentual de positividade por esquistossomose em Pernambuco de 2010 a 2019.



Fonte: SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE - PE, 2021.

No ano de 2019 em Pernambuco, 97 municípios fizeram monitoramento ativo para esquistossomose, a positividade de casos foram maiores nas cidades de Escada (317), Palmares (237), Jaboatão dos Guararapes (229), Paudalho (194), e Ipojuca (171). A partir da busca ativa de casos, 19 municípios foram enquadrados como prioritários para o combate à esquistossomose no quadriênio 2019-2022 (PERNAMBUCO, 2019; SES - PE, 2021).

Figura 6: Distribuição espacial dos municípios de Pernambuco com trabalho para esquistossomose (1) e municípios prioritários (2) segundo as Gerências Regionais de Saúde (GERES) em 2019.



Fonte: SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE - PE 2021.

2.3 ASPECTOS GERAIS DO *Schistosoma mansoni*

Platelmintos são agrupados em 4 classes e caracterizados por apresentarem simetria bilateral, uma extremidade anterior com órgãos sensíveis e responsáveis pela fixação, e uma extremidade posterior. São vermes achatados, devido a ausência de endoesqueleto, além disso não possuem aparelho respiratório, os espaçamentos entre os órgãos é preenchido por tecido conjuntivo. Podem ser de vida livre, endoparasitos ou ectoparasitos (REY, 2008; NEVES, 2016).

O *Schistosoma mansoni* faz parte da classe Trematoda, ou seja, corpo com ventosas, são endoparasitas obrigatórios. Geralmente esses vermes apresentam duas ventosas e tubo digestivo incompleto, a maior parte das espécies são

hermafroditas, exceto as da família Schistosomatidae que apresenta os sexos separados. O gênero *Schistosoma* é composto por 6 espécies: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. guineensis* (REY, 2008; NEVES, 2016).

2.3.1 Formas Evolutivas do *Schistosoma mansoni*

- Ovo

As fêmeas de *S. mansoni* colocam um ovo por vez, estima-se que diariamente ela ponha cerca de 300 ovos. O ovo apresenta coloração castanho-amarelada, com formato oval e na região mais alargada possui um espículo voltado para trás. A estrutura mede 110 a 170 µm e 45 a 70 µm de largura. A maturidade do ovo é caracterizada pela presença interna do miracídio, sendo possível de visualizar pela transparência da casca. Após atingir a maturidade os ovos têm cerca de 20 dias de vida, caso não ocorra a expulsão do miracídio, ele morre. A diferenciação das espécies de *Schistosoma* pode ser feita através da observação do ovo em amostras fecais (Figura 7) (REY, 2008; NEVES, 2016).

Figura 7: Ovos de *Schistosoma mansoni*.



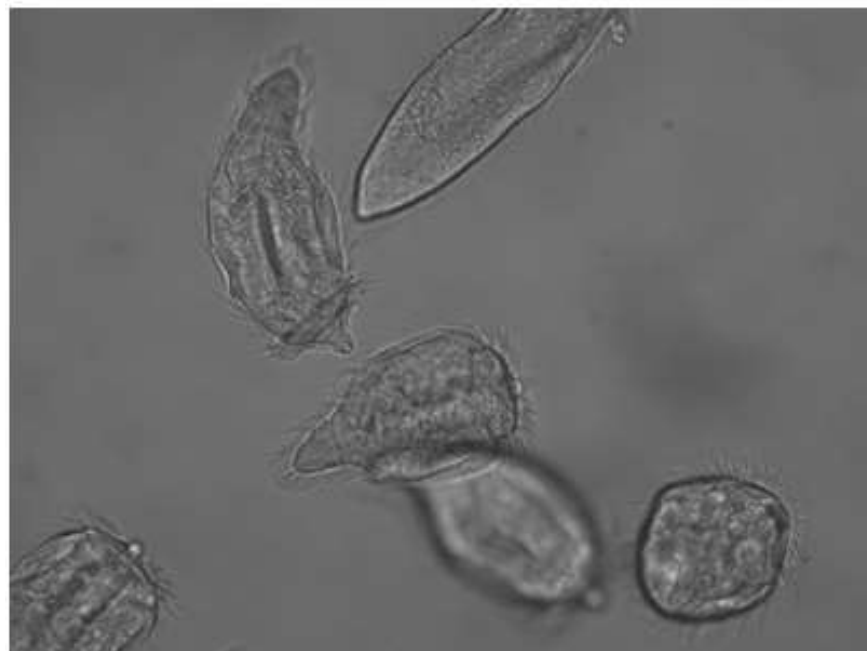
Fonte: <https://www.cdc.gov/>. Acesso: 12/04/2023.

- Miracídio

Após sair do ovo, a larva se alonga, apresenta forma cilíndrica e mede 180 µm de comprimento e 64 µm de largura. Os cílios que garantem sua movimentação aquática, se desenvolvem nas células epidérmicas. A extremidade anterior encontra-se o terebratorium (Tb) (Figura 8), onde estão localizadas as terminações nervosas, glândulas adesivas e sacos digestivos, além do conjunto de cílios maiores e espículo estruturas essencial para infecção do caramujo (REY, 2008; NEVES, 2016).

No miracídio se encontra de 50 a 100 células germinativas que garantem a continuidade do ciclo no molusco. A larva apresenta sistema nervoso primitivo caracterizado por uma estrutura central que sofre ramificações através de cordões nervosos e se conecta a células periféricas. O sistema excretor é formado por 4 células flama, que estão conectadas por canalículos drenados para ampola excretora e finaliza no poro excretor (REY, 2008; NEVES, 2016).

Figura 8: Miracídios de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: <https://portal.fiocruz.br/>. Acesso: 12/04/2023.

- Cercária

Após a quarta semana de infecção em temperaturas elevadas e na presença de luminosidade, os caramujos podem liberar cercárias nas coleções hídricas. As cercárias medem cerca de 500 μm , apresentam uma cauda bifurcada (230 μm de comprimento e 50 μm de largura) e o corpo cercariano (170 μm de comprimento e 70 μm de largura). As glândulas de penetração estão localizadas na ventosa oral formada por 4 pares pré-acetabulares e quatro pós-acetabulares e se ligam ao intestino primitivo. O acetábulo ou ventosa ventral é responsável pela fixação da cercária na pele do hospedeiro definitivo, por isso possui musculatura mais desenvolvida. Logo após a fixação a cercária perde a cauda, pois sua função é apenas de movimentação, não apresenta nenhum órgão internamente, já o corpo cercariano é essencial para o desenvolvimento do verme adulto (Figura 9) (PEREIRA et al., 2013; NEVES, 2016).

Figura 9: Cercária de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: NEVES, 2016, 13^o ed.

- Esquistossômulo

O corpo cercariano ao atingir o tecido do hospedeiro definitivo se transforma em esquistossômulo, devido a sinais de elevação de salinidade do meio. O parasita

fica localizado nessa região por 2 ou 3 dias, caso não seja eliminado pela resposta imunológica do homem, o esquistossômulo pode atingir a circulação sanguínea em direção ao coração e pulmões. No 6º dia após a infecção, os esquistossômulos chegam aos pulmões, se alongam atingindo 400 µm de comprimento e apresentam nas extremidades espinhos, área interna é preenchida por pigmento devido a degradação de hemoglobina (REY, 2008; NEVES, 2016; TEKWU et al., 2016)

Figura 10: Esquistossômulo de *Schistosoma mansoni*.



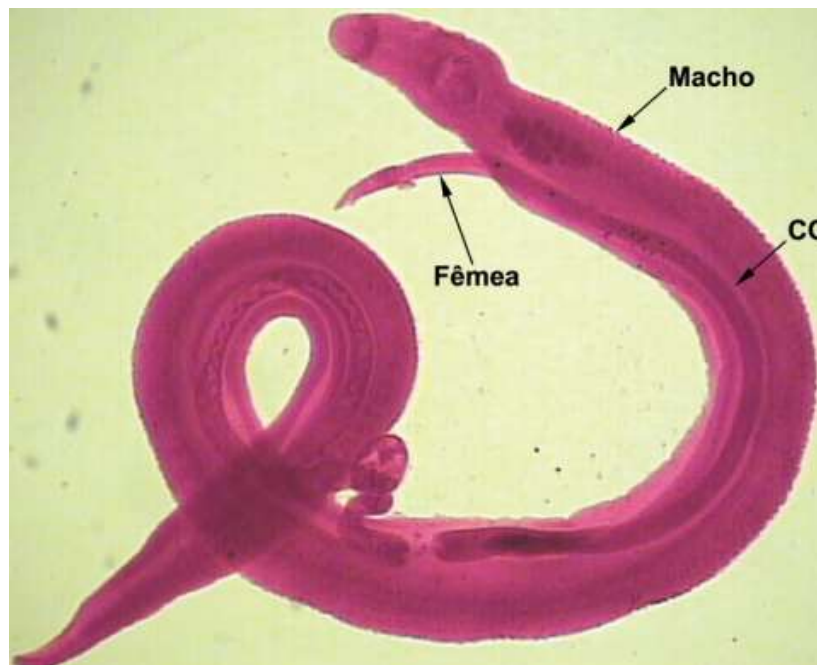
Fonte: <https://www.ucsf.edu/>. Acesso: 04/04/2023.

- Vermes adultos

São trematódeos se apresentam com morfologia alongada e delgada. O macho mede aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,11cm de largura, cor branca e tem o tegumento coberto por tubérculos. O corpo se divide em: porção anterior caracterizada pela presença das ventosas oral e ventral, além da ventosa posterior onde se localiza o canal ginecóforo (CG) (Figura 11), são dobradas na qual a fêmea se acopla e é fecundada. Após a ventosa oral se localiza o esôfago, atrás do acetábulo tem cerca de 8 massas testiculares conectadas ao canal ginecóforo, assim é possível fecundar a fêmea mesmo na ausência de órgão reprodutor (REY 2008; NEVES, 2016).

A fêmea é maior em comprimento, medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento e 0,016 cm de diâmetro e apresenta coloração mais escura, devido a presença de pigmentos derivados da digestão de sangue em seu tubo digestivo. Possui tegumento liso com poucos tubérculos, na extremidade anterior se localiza duas ventosas pequenas, a ventosa oral e o acetábulo. Na metade do corpo se localiza o ovário e útero que possui 1 ou 2 ovos, através do poro genital feminino ocorre a cópula e eliminação dos ovos (Figura 11) (REY 2008; NEVES, 2016).

Figura 11: Casal de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.



Legenda: CG: Canal ginecóforo. Fonte: SILVA, R. G., et al., 2009.

2.3.2 Ciclo Biológico

O *Schistosoma mansoni* possui ciclo de vida heteroxênico, ou seja, necessita de hospedeiros intermediários e hospedeiro definitivo, e é constituído por uma fase assexuada e outra sexuada (Figura 12). Os ovos são eliminados nas fezes ou ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, onde induzem inflamação e depois morrem. Quando eliminados ao atingir água doce (Figura 12.1), os ovos eclodem, resultando na liberação de miracídios de vida livre, forma infectante do hospedeiro intermediário,

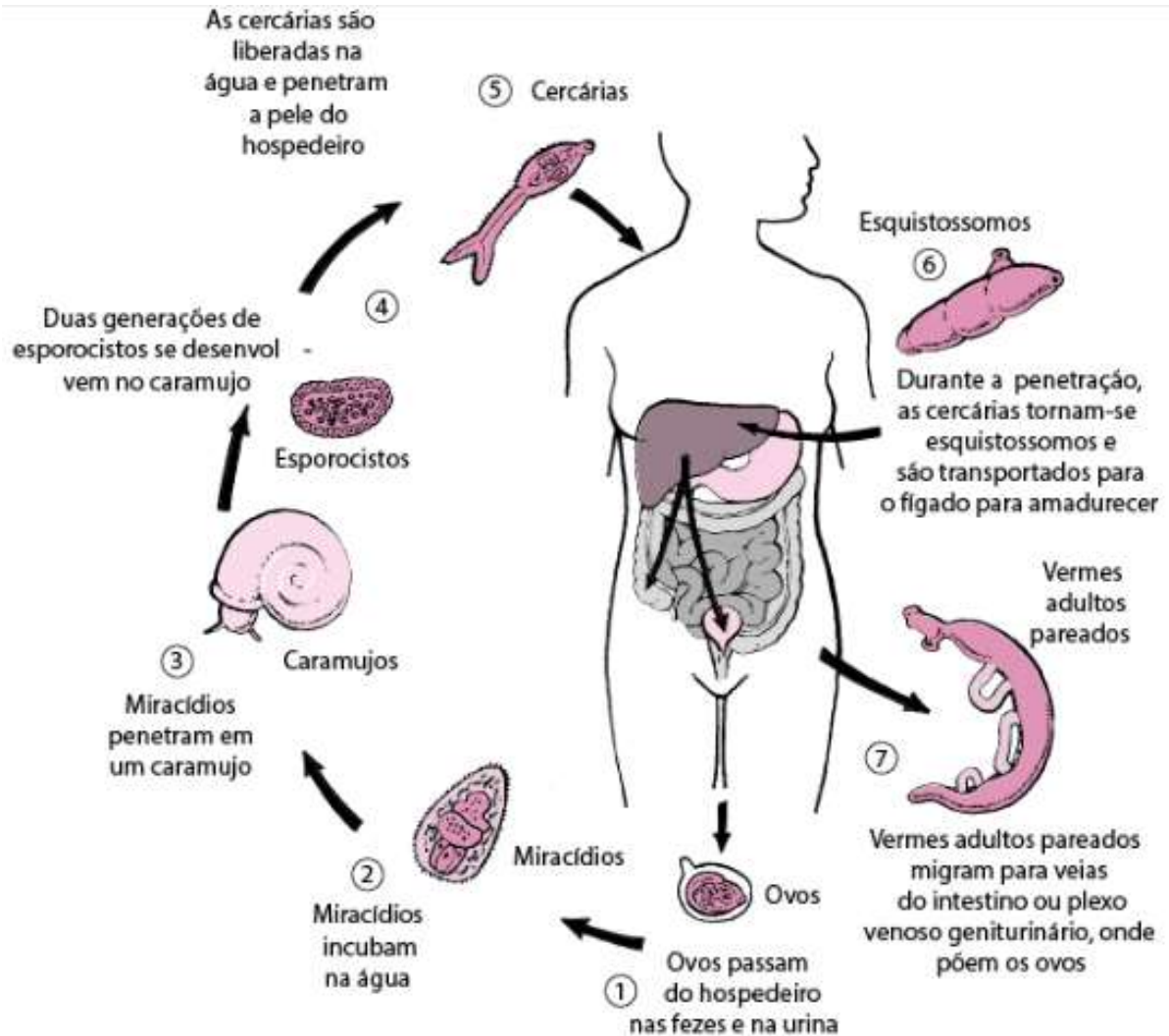
caramujos do gênero *Biomphalaria* (Figura 12.2 e 3) (REY 2008; NEVES, 2016; McMANUS et al., 2018).

Ao penetrar os caramujos, os miracídios passam por alterações morfológicas e fisiológicas se transformando em esporocistos primários. Por meio de reprodução assexuada geram esporocistos secundários e gradativamente esses aglomerados celulares vão se diferenciando em cercárias (Figura 12.4) que dentro de 30 dias após a infecção serão liberadas na água, quando o caramujo for exposto a elevadas temperaturas e luminosidade. Apenas um miracídio tem o potencial de gerar dezenas de milhares de cercárias (REY, 2008; COLLEY et al., 2014; LEWIS; TUCKER, 2014; McMANUS et al., 2018).

A fase sexuada tem início quando as cercárias penetram através da pele do homem ao ter contato com coleções hídricas contaminadas por caramujos infectados (Figura 12.5). Ao penetrar a pele humana a cercária perde a cauda bifurcada e o corpo cercariano se transforma em esquistossômulo (larvas em maturação) (Figura 12.6). Quando os esquistossômulos entram nos vasos venosos e chegam a corrente sanguínea são transferidos para os pulmões e coração, ao entrar na circulação arterial atingem o sistema porta hepático e migram para as veias mesentéricas, onde realizam sua maturação para vermes adultos (GRYSEELS et al., 2012; COLLEY et al., 2014).

No sistema porta intra-hepático, após os vermes se desenvolverem sexualmente macho acopla a fêmea no canal ginecóforo e migram para as veias mesentéricas no intestino e realizam acasalamento, a fêmea deposita cerca de 400 ovos diariamente, após aproximadamente 5 semanas de infecção (Figura 12.7). Os vermes vivem em média 5 anos, mas em casos extremos podem chegar a 20 anos. Os ovos saem do lúmen dos vasos sanguíneos pela mucosa intestinal e aproximadamente 50% são eliminados nas fezes após aproximadamente 45 dias da penetração das cercárias. Os outros 50% ficam em tecidos próximos ou se alojam no fígado e intestino. Caso os ovos entrem em contato com água doce, o ciclo reinicia e assim a esquistossomose se sustenta infectando milhões de pessoas no mundo (GRYSEELS et al., 2012; NEVES, 2016; McMANUS et al., 2018 e 2020).

Figura 12: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional>. Acesso: 04/03/2023.

2.4 FISIOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

As principais alterações fisiopatológicas causadas pela esquistossomose não são decorrentes da presença dos vermes adultos, mas sim dos ovos que ficam retidos nos tecidos. A presença dos ovos induz uma resposta imune inflamatória, resultando na formação de granulomas que em seguida dão lugar para depósitos fibróticos. São relatados na literatura 3 estágios de desenvolvimento da esquistossomose, que são

dividas em: fase aguda, ativa estabelecida e crônica tardia (McMANUS et al., 2018 e 2020).

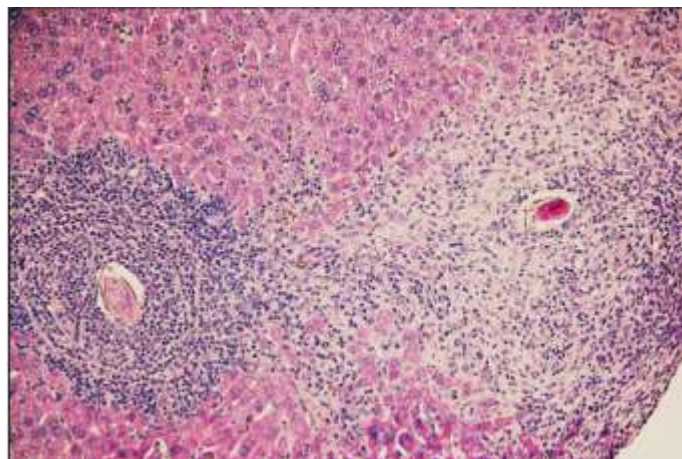
A fase aguda ou síndrome de Katayama, é bastante comum em regiões que apresentam altas taxas de transmissão do gênero *Schistosoma*. Raramente é relatada em casos de infecção por *S. mansoni*, sendo mais comum quando a infecção é causada por *S. japonicum*. Após ter contato com ambiente aquático contaminado, na pele, resposta imune inata a larvas mortas na tentativa de penetração originam reações de hipersensibilidade, podem causar uma reação maculopapular pruriginosa, chamada dermatite cercariana. A febre de Katayama ocorre principalmente em casos de primeira infecção e raramente em reinfecção. A síndrome é resultado da reação de hipersensibilidade sistêmica do homem à infecção por cercárias seguida da transformação para esquistossômulos, maturação dos vermes e deposição de ovos. Normalmente é assintomática em indivíduos de regiões endêmicas, é mais recorrente em viajantes, quando aparecem sintomas os pacientes citam ter tido contato com água doce 2 ou 3 semanas atrás (GRYSEELS et al., 2006; WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2020).

Os principais achados são: dermatite cercariana, mialgia, dor no quadrante superior direito, diarreia sanguinolenta, dores de cabeça, febre e tosse seca. Os exames de fezes ainda são negativos, no hemograma é possível observar eosinofilia e na radiografia do tórax presença de infiltrados pulmonares irregulares. A maior parte dos pacientes melhoram espontaneamente por volta de 2 - 10 semanas, poucos apresentam erupções cutâneas e a forma mais grave da doença, apresentando perda de peso, dor abdominal, hepatomegalia e diarreia (WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2020).

Normalmente pessoas que moram em regiões endêmicas a fase aguda da esquistossomose ocorre de forma assintomática, a doença se transforma rapidamente em infecção ativa estabelecida. A infecção ativa estabelecida apresenta manifestações clínicas devido a presença de vermes adultos produzindo ovos, parte desses ovos ficam alojados nos tecidos e outra parte é excretada nas fezes. Os vermes adultos se abrigam nos vasos sanguíneos e não desencadeiam nenhuma resposta imune, por conta da capacidade de adquirir antígenos do seu hospedeiro e por regenerar constantemente a superfície externa tegumentar, por meio de células-tronco somáticas (McMANUS et al., 2018 e 2020).

A presença de ovos no corpo desencadeiam respostas inflamatórias, resultando em lesões nos órgãos e consequentemente, alterações fisiológicas. A resposta inflamatória mediada por linfócitos CD4 + TH2 ocorre devido a secreção de glicoproteínas antigênicas secretadas pelos ovos. Essa secreção tem como finalidade auxiliar na migração dos ovos do vaso sanguíneo, onde a fêmea os deposita, para o lúmen do intestino, buscando a manutenção do ciclo de vida. Contudo, as glicoproteínas ativam uma resposta granulomatosa em volta do ovo, essa resposta é constituída por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, e consequentemente provoca lesões fibróticas no tecido do hospedeiro (Figura 13) (McMANUS et al., 2018; 2020).

Figura 13: Granulomas induzidos por ovos de *S. mansoni* no fígado de um rato infectado.



Fonte: COLLEY et al., 2014.

A manifestação clínica é diretamente proporcional à quantidade de ovos excretados, ou seja, carga parasitária e a reação granulomatosa. O desenvolvimento dos granulomas e em seguida a fibrose, são resultados da resposta imune CD4 + e TH2 mediada por IL-4 e IL-13. Os ovos de *S. mansoni* tem a capacidade de secretar proteínas de ligação a quimiocinas que se ligam aos neutrófilos, dessa forma bloqueia a entrada de neutrófilos na formação do granuloma, mas essas proteínas não possuem a habilidade de se ligar aos eosinófilos, por isso o granuloma em ovos de *S. mansoni* apresenta grande quantidade de eosinófilos. A infecção ativa estabelecida é o achado principal nas crianças que habitam regiões de alta endemicidade, essa fase

da doença é tratável com Praziquantel que mata os vermes adultos (GRYSEELS et al., 2006; McMANUS et al., 2018; 2020).

A fase crônica da doença está diretamente relacionada à resposta inflamatória granulomatosa aos ovos presos nos tecidos do hospedeiro. Na esquistossomose intestinal causada pela infecção do *S. mansoni* e *S. japonicum*, normalmente os ovos se depositam no fígado e nas paredes do intestino. Esse acúmulo de ovos na parede intestinal resulta em múltiplos granulomas e lesões teciduais, consequentemente alterações na funcionalidade do órgão, por meio de hiperplasia da mucosa intestinal, formação de úlceras e abscessos, causando ao paciente dor abdominal e diarreia mucossanguinolenta, resultado do trânsito frequente de inúmeros ovos para luz intestinal. Em casos mais graves, pode ocorrer o desenvolvimento de fibrose da alça retossigmoide causa redução dos movimentos peristálticos e constipação (COLLEY et al., 2014; WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2020).

Quando os ovos se alojam no tecido hepática, o desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa mediada pelos linfócitos CD4+ e TH2 resulta em fibrose periportal após a destruição dos ovos, progredindo para hipertensão portal e hepatoesplenomegalia. A fibrose ou fibrose de Symmer em formato de cachimbo, diferentemente de casos de cirrose ou outras doenças hepáticas, a função hepatocelular se mantém, contudo o acúmulo de granulomas resulta em alterações hepáticas graves. Clinicamente os pacientes apresentam dor abdominal com hepatomegalia nodular palpável e esplenomegalia. O desenvolvimento da hipertensão portal é consequência do intenso quadro fibrótico obstrutivo no sistema porta hepático, o corpo busca uma alternativa para diminuir essa pressão e manter a circulação sanguínea, por meio de um fluxo colateral anormal intra-hepático. Entretanto, essa circulação anormal é o fator que origina as varizes esofágicas, que em conjunto com a ascite ou como é popularmente conhecida barriga d'água, o paciente pode evoluir a óbito (WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2020).

Para a maioria das pessoas que habitam em áreas endêmicas a redução da carga de vermes é um processo gradual, à medida que a imunidade a novas infecções é adquirida. Assim o número de vermes diminui e consequentemente a quantidade de ovos depositados nos tecidos e excretados pelo hospedeiro. As novas infecções vão resultar em uma resposta inflamatória menor com granulomas menores, devido a regulação imunológica negativa e ao longo dos anos os granulomas anteriores são

substituídos por tecido fibroso após a morte dos ovos, ocorrendo uma redução dos sintomas (McMANUS et al., 2018; 2020).

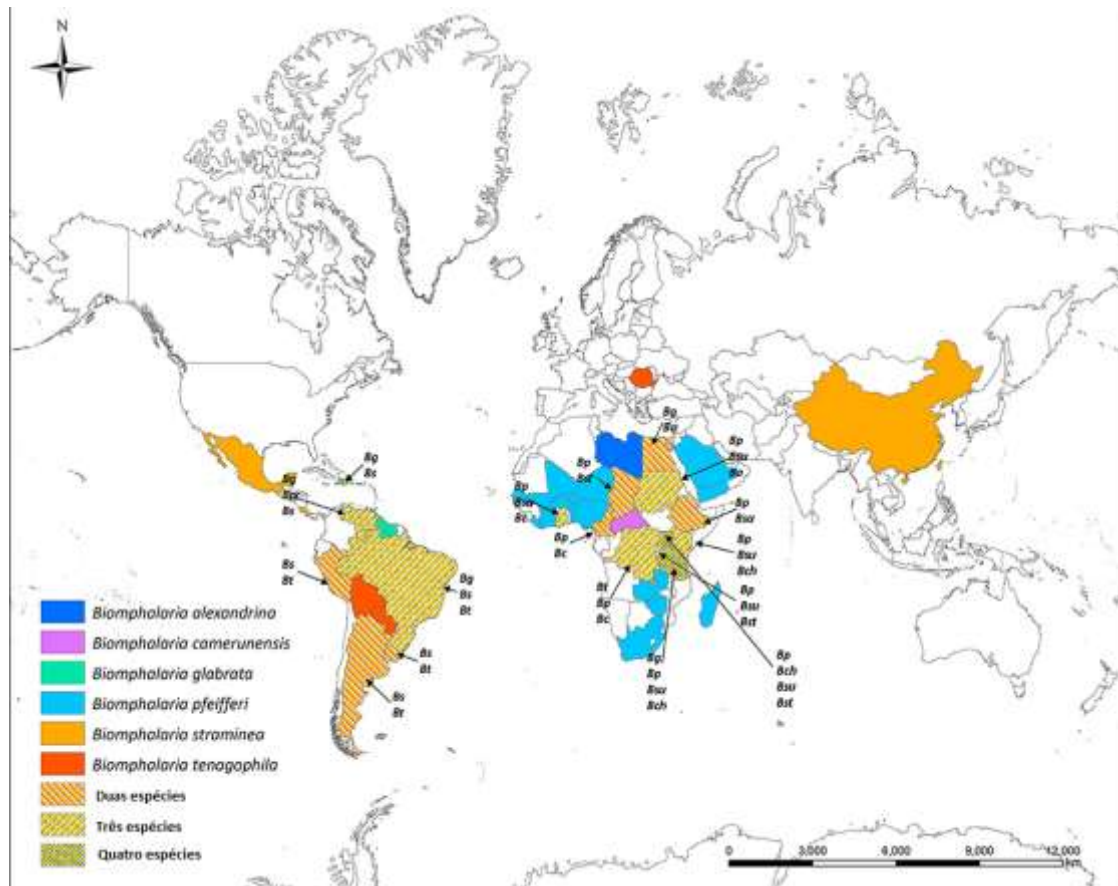
Na esquistossomose urogenital ocorre pela infecção por *S. haematobium*, o hospedeiro pode liberar os ovos na urina ou podem ficar acumulado na bexiga e ureter, clinicamente o paciente apresenta hematúria, disúria e polaciúria. O espessamento da bexiga e formação de pseudopólipos e massas hipertróficas são consequências da resposta inflamatória granulomatosa em volta dos ovos. Com o passar de anos de infecção, pacientes podem desenvolver obstrução do ureter e uretra, calcificação da bexiga, infecções bacterianas secundárias e insuficiência renal. Pesquisas epidemiológicas demonstram a relação da esquistossomose urogenital com carcinoma de células escamosas da bexiga em áreas endêmicas para infecção por *S. haematobium* (COLLEY et al., 2014; WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2020).

2.5 HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

2.5.1 Distribuição Geográfica

Existem 34 espécies do gênero *Biomphalaria* espalhadas pelo globo e 4 estão infectadas com *S. mansoni*, as outras espécies podem se tornar vetores se expostas experimentalmente em laboratório (Figura 14). Invasões em novas regiões têm sido uma atividade recorrente, essa ampla distribuição atravessando oceanos do oeste para leste do globo, pode ter ocorrido por meio de aves aquáticas ou vegetação. *B. glabrata* está presente na América do Sul e em parte da América Central, *B. tenagophila* se localiza predominantemente no Sul do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru, Bolívia, Romênia e em parte do continente africano, *B. straminea* é encontrada no Nordeste brasileiro, em parte do continente americano, China e Hong Kong (CASTILLO et al., 2020; HABIB et al., 2021).

Figura 14: Distribuição global de espécies suscetíveis de *Biomphalaria* spp.



Legenda: *Biomphalaria alexandrina* (Ba); *Biomphalaria camerunensis* (Bc); *Biomphalaria choanomphala* (Bch); *Biomphalaria glabrata* (Bg); *Biomphalaria pfeifferi* (Bp); *Biomphalaria prona* (Bpr); *Biomphalaria straminea* (Bs); *Biomphalaria stanleyi* (Bst); *Biomphalaria sudanica* (Bsu); *Biomphalaria tenagophila* (Bt).

FONTE: HABIB et al., 2021.

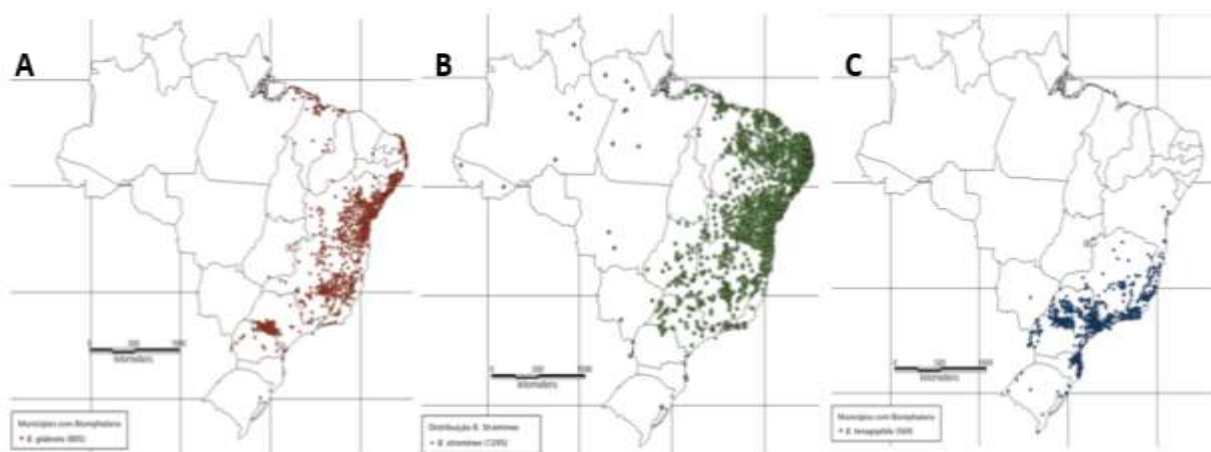
No Brasil, *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* são as 3 espécies vetores do *S. mansoni*. A presença da *Biomphalaria glabrata* no continente americano é de grande importância como hospedeira intermediária do *S. mansoni*, já que apresenta elevada suscetibilidade a várias cepas do parasita, além de altos níveis de infecção e está fortemente associada à ocorrência da esquistossomose no Brasil, tendo sido localizada em ambientes naturais que a positividade atinge 80%. A espécie foi notificada nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do

Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe e Distrito Federal (Figura 15-A), em um total de 801 municípios (BRASIL, 2014).

A *Biomphalaria straminea* é uma espécie altamente adaptada às variações climáticas e é encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil (Figura 15-B). É menos suscetível que a *B. glabrata*, essa espécie é responsável pela manutenção de altas taxas de infecção humana em algumas localidades do Nordeste brasileiro, onde a taxa pode superar 50%. A presença da *B. straminea* foi registrada em 1.280 municípios de 24 estados brasileiros, excluindo apenas o Amapá e Rondônia. A espécie é epidemiologicamente a mais importante no país, pois apresenta vasta distribuição, especialmente no Nordeste (BRASIL, 2014).

A *Biomphalaria tenagophila* é uma espécie com grande importância epidemiológica na transmissão do *S. mansoni* no Sul e Sudeste brasileiro (Figura 15-C). A espécie é responsável pela maioria dos casos de esquistossomose no estado de São Paulo e pelos focos da doença no estado de Santa Catarina. A espécie foi notificada de forma contínua numa faixa litorânea que se estende desde o sul do estado da Bahia até o estado do Rio Grande do Sul, somando 10 estados brasileiros, além do Distrito Federal, em cerca de 562 municípios (BRASIL, 2014).

Figura 15: Distribuição espacial no Brasil das espécies de *B. glabrata* (A), *B. straminea* (B) e *B. tenagophila* (C).



Fonte: BRASIL - VIGILÂNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE, 2014

2.5.2 Aspectos gerais do Gênero *Biomphalaria*

Os caramujos de água doce foram caracterizados como principais vetores da esquistossomose no século XX, sendo incluídos ao grupo de invertebrados de importância médica. Um dos fatores que garante a ampla distribuição mundial da parasitose é a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários, estabelecendo a manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni*. Atualmente, 4 espécies do gênero *Biomphalaria* atuam como hospedeiro intermediário do *S. mansoni* (*B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea* e *B. prona*), já as outras espécies demonstraram-se suscetibilidade a infecção experimental (CASTILLO et al., 2020; HABIB et al., 2021).

Os vetores do *S. mansoni* pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae, subfamília Planorbinae, apresentam concha enrolada em espiral plana e gênero *Biomphalaria*, caracterizados por concha discoidal com aprofundamento do giro central, são 11 espécies e 1 subespécie. O gênero *Biomphalaria* é caracterizado por conchas discoidais de 40 mm de diâmetro, devido a presença de hemoglobina a hemolinfa é avermelhada. Os moluscos também possuem sistema cardiorrespiratório, digestivo, nervoso e urogenital (REY, 2008; NEVES, 2016).

No Brasil, 3 espécies são naturalmente infectadas, *B. tenagophila* tem concha com 15 a 35 mm de diâmetro, 11 mm de largura e 7-8 giros, não apresenta a crista e linha renal no manto, possibilitando a diferenciação da *B. glabrata*. *B. straminea* possui 10 a 16 mm de diâmetro, 3 a 4 mm de largura e 5 giros arredondados. Apresenta ondulações transversais nas paredes dorsal e a esquerda da vagina, diferenciando-se das outras espécies. A *B. glabrata* (Figura 16), é a principal espécie vetora no país, por apresentar maior susceptibilidade ao *S. mansoni*, podendo liberar 18 mil cercárias diariamente, assim é o vetor que possui alto êxito na transmissão da esquistossomose. A concha mede de 20 a 40mm de diâmetro, 5 a 8 mm de largura e 6-7 giros, apresenta crista pigmentada sobre o tubo renal, aspecto que a diferencia das outras espécies (NEVES, 2016).

Figura 16: *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* no Brasil.



Fonte: CARVALHO et al., 2008.

As espécies de *Biomphalaria* costumam habitar em coleções hídricas com temperatura de 20-26° C, rica em matéria orgânica e luminosidade, ficam próximas às margens devido a presença de vegetação, pois sua alimentação é constituída majoritariamente por fibras. São hermafroditas, ou seja, apresentam ambos os sexos, assim possuem a capacidade de autofecundação, porém para garantir a variabilidade genética realizam reprodução cruzada quando estão em grupo. Os caramujos têm elevado potencial de colonização, em aproximadamente 30 dias atingem a idade reprodutiva e começam a oviposição. Apenas um caramujo tem a capacidade de gerar cerca de 10 milhões de embriões, no curto intervalo de 90 dias. As desovas, massas gelatinosas com ovos, são liberadas pelos caramujos normalmente durante a noite em áreas sólidas, como objetos poluentes ou na concha de outros moluscos, após 7 dias ocorre a eclosão (REY, 2008; NEVES, 2016).

Ao realizar a oviposição, o caramujo deposita em superfícies desovas no estágio de ovócito I e dando sequência ao desenvolvimento ocorre meiose para ovócito II. Em seguida, inicia-se ciclos de clivagens celulares com o objetivo de atingir entre 0 a 15 horas, depois da primeira clivagem o estágio embrionário chamado de blástula (Figura 17-A). O segundo estágio (Figura 17-B), gástrula se inicia após 24 h da primeira clivagem, marcado pelo fim dos ciclos de clivagem e inicialização do

crecimentos, diferenciação e movimentação das células, através de invaginação na qual os pólos transformam-se e o embrião altera a forma arredondada para achatada. O estágio de trocófora (Figura 17-C) se inicia entre 48 - 78h após a primeira clivagem e caracteriza a primeira fase larval, marcada pelo desenvolvimento do prototroco (divide a larva em região pré-trocal e pós-trocal). O estágio de véliger (Figura 17-D) se inicia após 96 h da primeira clivagem e se evidencia pela formação da concha, além de intensa movimentação embrionária. Depois de 144h inicia o estágio de *hippo stage* (Figura 17-E), marcado pelo desenvolvimento completo do embrião com aparecimento do tentáculo e olhos, seguindo para eclosão que ocorre a 25°C em 7 dias após a primeira clivagem (144h) (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008).

Figura 17: Estágio embrionário da *Biomphalaria glabrata*. Blástula (A), Gástrula (B), Trocófora (C), Véliger (D) e *Hippo stage* (E).



Fonte: ARAÚJO et al, 2018a.

2.6 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE

A manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni* depende de pessoas infectadas, contaminação fecal de coleções hídricas, na qual habitam caramujos suscetíveis a infecção e em seguida o contato do homem com essa água ocupada por moluscos infectados. A esquistossomose possui um ciclo complexo de transmissão, além da variedade de fatores que favorecem a doença, para o controle é necessário diversas medidas profiláticas, como; diagnóstico no estágio inicial e tratamento, ações de vigilância e controle dos vetores, intervenções educativas em saúde para população, melhorias no sistema de saneamento básico e moradia (BARBOSA et al., 2008; BRASIL, 2014).

No ano de 1950 a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou a criação de diretrizes para análise e combate à esquistossomose. No primeiro relatório publicado em 1953, a OMS determinou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico confiáveis e de fácil manipulação, descobertas de moluscidas de alvo-específico aos vetores com baixo impacto ambiental e custo, busca por fármacos seguros e eficazes, além da execução de atividades preventivas e monitoramento de crianças em idade escolar. Nas décadas seguintes, os relatórios orientavam seguir com tratamento dos infectados, redução ou prevenção de contaminação de coleções hídricas por meio de saneamento básico e distribuição de água encanada, controle dos hospedeiros intermediários e ações educativas (BARBOSA et al., 2008).

Em 1980, a OMS mudou a forma de controle da esquistossomose, focando no tratamento de infectados e intervenções visando a prevenção, o homem foi o centro das ações e como formas de controle auxiliares, uso de moluscidas. Nas décadas anteriores o foco principal era controlar a transmissão. No ano de 2000, a OMS visa o controle da esquistossomose em conjunto com outras geo-helmitoses. As estratégias recomendadas visavam diagnosticar e tratar os infectados com base na particularidade de cada região (BARBOSA et al., 2008).

Na Assembleia Mundial de Saúde a OMS estabeleceu um novo roteiro de doenças tropicais negligenciadas para 2021-2030, cujo as metas visam a eliminação da esquistossomose da problemática em países endêmicos, além de impedir a transmissão. O plano de controle é focado na redução da parasitose através de tratamento periódico e em larga escala com praziquantel em crianças, adultos com

profissões que têm contato com locais de risco, por exemplo pescadores, e comunidades de áreas endêmicas. Além de melhorias no sistema de saneamento básico e controle dos vetores (WHO, 2023).

Mesmo com os diversos avanços na ciência e tecnologia com produção de medicamentos e moluscidas, o gerenciamento de controle da esquistossomose não tem alcançado todas as metas estabelecidas pela OMS. Além da complexidade do ciclo de vida do parasito e da ampla distribuição espacial de hospedeiros intermediários suscetíveis ao *S. mansoni*, o moluscida utilizado no momento apresenta alta toxicidade ambiental e elevado custo, apresentando efeito apenas temporário. A estratégia de tratamento em larga escala com praziquantel diminui a morbidade, contudo não controla a transmissão da esquistossomose e existem relatos de reinfecção e resistência, além do fato do fármaco apresentar atividade esquistossomicida apenas contra vermes adultos. Ademais, não tem no mercado vacina disponível, seguem em processo experimental, os pesquisadores estão buscando uma saída em meio a complexidade de baixos recursos financeiros, mecanismos de escape do *S. mansoni* e resposta imune do hospedeiro definitivo (BARBOSA et al., 2008; BRASIL, 2008; McMANUS et al., 2020; TEDLA et al., 2020).

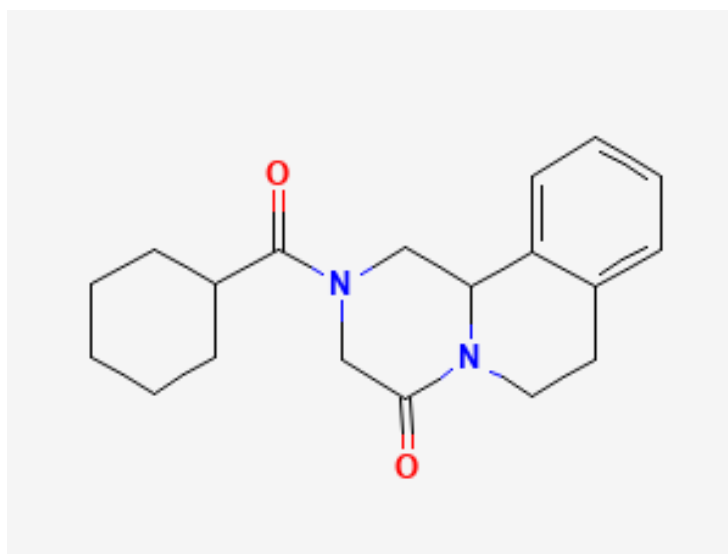
2.6.1 Tratamento quimioterápico e praziquantel

Na década de 1960, ocorreu a produção biológica da oxamniquina, um derivado do tetraidroquinoleínico dos tioxantônico com atividade esquistossomicida altamente promissora. Por volta de 30 anos que essa substância é amplamente utilizada no continente americano, inclusive no Brasil, onde a única espécie endêmica é o *S. mansoni*. Apesar de ser segura e ter efeitos colaterais limitados, a oxamniquina apresenta a desvantagem por ter ação apenas contra o *S. mansoni*, sendo que a sulfotransferase enzima desse parasita é o alvo principal dessa droga. Como substituto do fármaco, o praziquantel (PZQ) vem sendo utilizado desde 2010, tornando a oxamniquina uma droga ultrapassada (LAGO et al., 2017).

Em 1970, foram desenvolvidos diversos compostos com atividade esquistossomicida, tais como tubercidina, amoscanato, praziquantel e entre outros, contudo, muitos efeitos colaterais dessas drogas foram constatados. No final da

década de 1970, o praziquantel (Figura 18) surgiu como um derivado da pirazino-isoquinoleínico e foi reconhecido como melhor opção para o tratamento da esquistossomose, sendo a medicação de escolha em áreas endêmicas. O praziquantel é altamente eficiente no tratamento de todas as espécies de vermes adultos do gênero *Schistosoma*, mas apresenta pouca atividade contra vermes jovens e não causa toxicidade significativa a longo prazo em humanos. Além disso, apresenta vantagens como o custo baixo, administração única com alta eficácia, quando se leva em consideração taxa de cura e redução da produção de ovos, possui também amplo perfil de ação, alta tolerabilidade e efeitos colaterais leves e transitórios (LAGO et al., 2017; McMANUS et al., 2018).

Figura 18: Representação da estrutura química do Praziquantel.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso: 29/03/2023.

O mecanismo de ação do PZQ ainda não está bem esclarecido, evidências indicam que o fármaco aumenta a absorção de cálcio. Como nos eucariotos, Ca^{2+} é um elemento chave na manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni*, as baixas concentrações desse íon é importante para manutenção da homeostase fisiológica do verme, principalmente no processo de contratilidade muscular (WALKER, 2011). Assim, a exposição do *S. mansoni* ao PZQ é acompanhada do aumento de Ca^{2+} que consequentemente ocasiona uma intensa contração muscular e posterior paralisia do verme, com isso, o verme perde sua capacidade de adesão e são transportados para

o fígado onde serão eliminados (ARAGON et al., 2009; YOU et al., 2013). Além disto, PZQ causa alterações morfológicas que podem ser observadas no tegumento do verme, caracterizadas por vacuolizações na base do sincício tegumentar, bolhas e erupções na superfície. Essas alterações morfológicas são acompanhadas por um aumento da exposição dos vermes aos antígenos esquistossomóticos na superfície do parasita, relacionados com a resposta imune do hospedeiro que é necessária para a atividade completa do praziquantel (AIRES et al., 2014; ARAÚJO et al., 2019; SILVA et al., 2020).

O praziquantel apresenta limitações, não possui atividade muito significativa contra as formas mais jovens do *Schistosoma*, não impossibilita reinfecções e tem sido relatado na literatura casos de infecções por *S. mansoni* e *S. haematobium* que são pouco ou não respondem ao praziquantel em regiões de intensa utilização do fármaco. Ademais, estudos experimentais com camundongos tratados repetidas vezes demonstraram redução da sensibilidade dos vermes ao PZQ. Nesse cenário de limitações, na década de 1980, começou-se a explorar metabólitos naturais com atividades esquistossomicidas. E, nas últimas décadas, houve um aumento significativo do interesse da comunidade científica em pesquisar e desenvolver novas drogas para combater a esquistossomose (LAGO et al., 2017; McMANUS et al., 2018).

2.6.2 Controle de Vetores

Até 1970, o controle da esquistossomose era realizado principalmente através da redução da população de hospedeiros intermediários. Esse plano de ação envolvia a utilização de metodologias químicas, físicas ou biológicas para diminuição da distribuição e da abundância das espécies do gênero *Biomphalaria*. Diversas substâncias químicas foram testadas e aplicadas como moluscicidas, visando matar os caramujos, incluindo a cal extinta, o sulfato de cobre, o pentaclorofenato de sódio, a tritilmorfolina e a niclosamida (vendida como Bayluscide) (BARBOSA et al., 2008; BRASIL, 2014).

Na década de 80, depois do desenvolvimento de fármacos para o tratamento da esquistossomose, o objetivo central de combate se tornou o controle da morbidade. No cenário atual, o plano de combate é associar a utilização de quimioterápico com

medidas profiláticas, como a educação em saúde, controle de vetores e o saneamento básico, objetivando remover a esquistossomose como problema de saúde pública até o ano de 2030 (BARBOSA et al., 2008; COLLEY et al., 2014; WHO, 2023).

Para uma substância química ser considerada um moluscicida precisa seguir certos critérios como; apresentar eficácia contra os moluscos em baixas concentrações, baixo custo, não apresentar toxicidade para os humanos e ambiente e ser de fácil aplicação, considerando esses aspectos todas as substâncias citadas anteriormente foram consideradas prejudiciais ao meio ambiente. Entretanto, apenas a niclosamida, produzida pela indústria farmacêutica Bayer, foi amplamente utilizada nas campanhas nacionais de controle da esquistossomose (BARBOSA et al., 2008; BRASIL, 2014).

A niclosamida, moluscicida recomendado pela OMS para o controle populacional dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma*, apresenta alta toxicidade contra os moluscos nos diferentes estágios de desenvolvimento. Contudo o composto químico apresenta desvantagens como; baixa seletividade biocida, elevado custo para aplicação, dificuldade de transporte, necessidade de aplicações frequentes, instabilidade sob luz solar, causa irritabilidade dérmica e mucosa e induzir resistência e/ou tolerância em algumas cepas de caramujos (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; COELHO; CALDEIRA, 2016; SANTOS et al., 2020).

2.7 PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVAS MOLUSCICIDAS

Uma alternativa crucial para diminuir ou eliminar a esquistossomose é o controle populacional de caramujos do gênero *Biomphalaria*. No entanto, atualmente, a OMS preconiza a utilização de niclosamida somente em casos de alta prevalência, devido ao seu alto custo, à elevada toxicidade ambiental para a fauna e flora local, além de outras problemáticas. Devido a essas limitações, existe um interesse em descobrir novos moluscicidas de derivados naturais ou sintéticos, que sejam seguros para o meio ambiente, estáveis, seletivos e que apresentem uma relação custo-benefício vantajosa em sua produção e aplicação (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; ARAÚJO et al., 2018a; SILVA et al., 2019).

A diversidade de compostos químicos presentes em produtos naturais apresenta propriedades biológicas e terapêuticas diversas. Atualmente, é conhecido que cerca de 12,5% das espécies de plantas superiores possuem propriedades medicinais e fornecem moléculas bioativas, que representam a principal fonte dessas substâncias. No entanto, ainda há muitos compostos que não foram testados quanto às suas propriedades biológicas, o que pode levar a um aumento significativo desses números. Na atualidade, mais de um quarto de todas as drogas comercializadas são obtidas a partir de compostos isolados de extratos de plantas, enquanto outras são sintetizadas de forma análoga (NTUNGWE et al., 2020).

Nesse cenário, diversos estudos são realizados com produtos naturais visando encontrar alternativas moluscicidas e cercaricidas para o controle da esquistossomose. O potencial moluscicida de 23 extratos de plantas medicinais do nordeste brasileiro foi demonstrado contra os embriões e caramujos adultos de *B. glabrata*. As plantas *Annona muricata* e *Marsdenia altissima* causaram 100 e 80% de mortalidade sobre os moluscos adultos, já a *Caesalpinia echinata* demonstrou ser promissora contra os embriões, matando 100% (de S. LUNA et al., 2005). A ação embriotóxica do extrato etéreo de *Cladia aggregata* foi evidenciada nas concentrações de 15 e 20 µg/mL causando 50% de mortalidade. A atividade moluscicida do composto foi comprovada no intervalo de 10,5 a 25 µg/mL, ocasionando em 100% de mortalidade dos moluscos nas concentrações mais altas, resultado semelhante foi observado com ácido bárbaro de *Cladia aggregata* (MARTINS et al., 2017).

Outro composto estudado foi o extrato salino e frações de *Bauhinia monandra* contra os estágios embrionários e caramujos adultos de *B. glabrata*. A concentração de 50% de letalidade (CL₅₀) para caramujos adultos foi atingida nas concentrações de 0,87 e 6,6 mg/mL do extrato salino e frações, respectivamente. Além da ação moluscicida, a fração de *B. monandra*, causou 100% mortalidade em cercárias de *S. mansoni* (AGUIAR et al., 2022). A propriedade tóxica do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata* contra os estágios embrionários da *B. glabrata* foi evidenciada nas concentrações 1,62; 4,45; 5,36 e 4,49 µg/mL, atingindo a CL₉₀ para blástula, gástrula, trocófora e véliger, respectivamente e 3,45 µg/mL para caramujos adultos, após 24 h de exposição ao composto (ARAÚJO et al., 2018a).

A *Ramalina aspera* demonstrou atividade moluscicida ao ocasionar 90% de mortalidade nas concentrações 22,78; 24,23; 16,63 e 16,03 µg/mL nos estágio de

blástula, gástrula, trocófora e véliger, respectivamente, contra caramujos adultos o mesmo percentual de letalidade foi observado na concentração de 8,66 µg/mL, após 24 h de exposição. A atividade cercaricida foi observada a partir da concentração de 5,0 µg/mL (SILVA et al., 2019). Extrato salino e fração de sementes de *Parkia pendulae* apresentaram potencial citotóxico e genotóxico sobre os estágios embrionários, além da ação cercaricida. O extrato salino causou 90% de letalidade nas 64,25; 479,62; 731,28; 643,28; 408,43 e 250,94; 318,03; 406,12; 635,64; 1,145 mg/mL, nos estágios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage*, respectivamente, contra os moluscos adultos a CL₉₀ foi alcançada na concentração de 10,92 mg/mL. O extrato salino e fração apresentou atividade cercaricida, a concentração de 1 mg/mL resultou em alteração na motilidade, reduzindo sua capacidade de penetração (BATISTA et al., 2022).

Por fim, considerando o breve ciclo embrionário das espécies *Biomphalaria* spp., substâncias capazes de afetar negativamente o desenvolvimento embrionário do vetor ou o molusco adulto em um curto período de exposição são altamente promissoras.

2.7.1 Bioindicador: *Artemia salina*

A variedade de atividades biológicas e farmacológicas dos produtos naturais podem torná-los uma valiosa fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, é necessário levar em consideração a potencial toxicidade para evitar efeitos colaterais adversos, que são comuns. Por isso, estudos de toxicidade devem ser conduzidos associados com a avaliação da atividade farmacológica, a fim de garantir a segurança de seu uso como drogas potenciais. Atualmente, há uma tendência para limitar o uso de animais de laboratório em testes toxicológicos. Nesse cenário, a *Artemia salina*, artrópode de meio aquático salino e de águas salobras, apresenta certa sensibilidade a diversas substâncias, sendo utilizadas como teste rápido e simples para avaliar toxicidades e atividades biológicas de produtos naturais. O uso desse modelo aumentou bastante nos últimos anos, em 1990 eram 7.405 estudos e em 2015 subiu para 88.384, enquanto que o uso de alguns modelos vertebrados sofreu redução (FREIRES et al., 2016; NTUNGWE et al., 2020).

Artemia salina tem ciclo de vida curto, elevada taxa de fecundidade e são obtidas após eclosão do cisto facilitando a manipulação em laboratório. Os bioensaios são vantajosos por detectarem compostos tóxicos para o bioindicador sensível, não apenas alvos específicos de toxina. Ademais, são uma opção econômica e apropriada para laboratórios pequenos com recursos limitados. Devido a isso, a *A. salina* é amplamente empregada como modelo de laboratório mundialmente, sendo utilizada para avaliação da citotoxicidade e na seleção de produtos naturais com maior potencial para conter componentes ativos. Esses organismos são escolhidos devido à sua receptividade genética e baixo custo. Entretanto, deve-se destacar que os invertebrados, como o *A. salina*, apresentam um sistema orgânico primitivo e não possuem um sistema imunológico adaptativo, limitando sua utilidade em relação a doenças humanas. Outros animais aquáticos como; *Danio rerio* e *Thamnocephalus platyurus* são utilizados na avaliação de toxicidade, a *A. salina* apresenta menor sensibilidade quando comparada, mas é o melhor ensaio quando se busca por simplicidade nos procedimentos e baixos custos, além de evidenciar a toxicidade em menores volumes (NTUNGWE et al., 2020).

2.8 NAFTOQUINONAS

O composto quinona pode ser dividido em três grupos com base em suas estruturas químicas: antraquinonas, benzoquinonas e naftoquinonas, que possuem um anel naftaleno. As quinonas são vastamente distribuídas em micróbios, plantas e animais e incluem compostos naturais como plumbagina, lawsone, lapachol, juglona, α -lapachona e β -lapachona com amplo espectro de atividades biológicas. A literatura evidencia diversas propriedades farmacológicas associadas às naftoquinonas, tais como ação antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, anticancerígena e anti-alérgica. Fora isso, os substituintes das 1,4-naftoquinonas também apresentam atividades farmacológicas, como ação antialérgica, apoptótica, antifúngica, antibiótica, antiviral, antifúngica, anticoagulante, inibidora de lipoxigenases, além de ação eliminadora de radicais. As 1,4-naftoquinonas demonstraram propriedades anticancerígenas, sendo benéficas no tratamento de câncer de fígado, mama e

carcinoma cervical humano, através da indução da morte celular (LEE et al., 2011; RAHMAN et al., 2022) .

As naftoquinonas apresentam ação antimicrobiana por meio de geração de espécies reativas de oxigênio, alterações na permeabilidade da membrana, inibição das bombas de efluxo e biofilme, além de impedir a ação da DNA girase. A 1-4-naftoquinona demonstrou sua ação antibactericida contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter Spp.* (ESKAPE) e outros microrganismos que apresentam multirresistência (MONE et al., 2023). Além do potencial antibactericida, as naftoquinonas são promissores antifúngicos, foi observada ação de 30 naftoquinonas de origem sintética e natural contra *Candida spp* com eficácia maior que as drogas usadas no tratamento (FUTURO et al., 2018). A atividade antiprotozoária das naftoquinonas é ampla e bastante promissora, apresentando ação contra *Leishmania spp.* (Leishmaniose), *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (doença de Chagas), *Plasmodium falciparum* (Malária) e *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose), estudos demonstram que a ação se assemelha aos fármacos de referência utilizados no tratamento, sendo possíveis alternativas no tratamento de doenças negligenciadas (PINTO; CASTRO, 2009; DANTAS-PEREIRA et al., 2021; ORTIZ-PÉREZ et al., 2021; RAMOS-MILARÉ et al., 2022; RANI et al., 2022).

Dentre o amplo espectro de propriedades farmacobiológicas, as naftoquinonas se demonstraram promissoras drogas esquistossomicidas. Ao analisar o uso tópico de 1,4- e 1,2-naftoquinonas, observou-se que foi capaz de impedir a penetração cutânea de cercárias de *S. mansoni*. Dos 23 derivados de naftoquinona sintetizados analisados, 15 demonstraram proteção quase total quando aplicados em solução na cauda de camundongos 24 horas antes da exposição às cercárias (PINTO et al., 1977). O uso tópico de pomada derivada de lapachol na cauda de camundongos teve ação preventiva contra penetração das cercárias, podendo reduzir a infecção em até 100% (AUSTIN; FRAPPAOLO, 1973). Além da ação sobre as cercárias, as naftoquinonas evidenciou ter potencial esquistossomicida contra os diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni*. Ao administrar dose intraperitoneal de 50 mg/kg de β -lapachona em camundongos infectados, foi observada redução de 29%, 37%, 24% e 40% nas fases de esquistossômulo cutâneo, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos, respectivamente. Também houve diminuição no

número de ovos e granulomas presentes no tecido hepático (AIRES et al., 2014). Em derivados de 2-metil-1,4-naftoquinona foram identificados como potentes e específicos inibidores da tioredoxina-glutationa redutase (SmTGR) do *S. mansoni*, que é considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas esquistossomicidas (JOHANN et al., 2015).

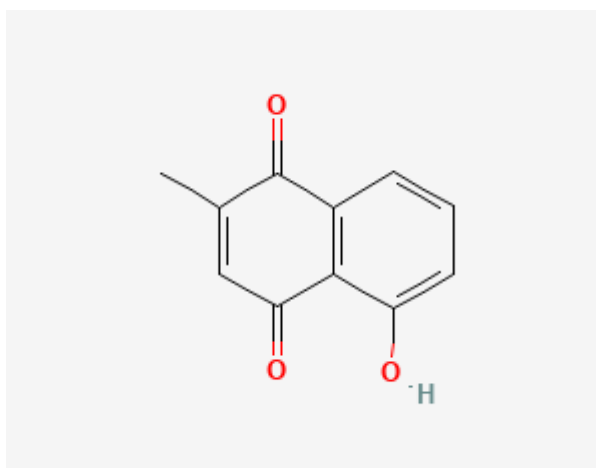
Uma outra forma de combater a esquistossomose através das naftoquinonas é por meio da sua propriedade moluscicida, na concentração de 40 µg/ml, o fosfato de artemisinina-naftoquinona matou 100% dos caramujos de *B. alexandrina* no intervalo de 24 h. Além da ação contra miracídeos e cercárias de *S. mansoni* (EL-BESHBISHI et al., 2015). A artemisinina-naftoquinona possui potencial esquistossomicida sobre estágios de *S. haematobium* e seu vetor, o *Bulinus truncatus*. Vermes adultos foram tratados com 20 µg/mL de artemisinina-naftoquina e resultaram em 25-100% de mortalidade em 48 - 72 horas. Os moluscos foram todos mortos na concentração de 20 ppm em 24 h, além disso o composto causou 50% de letalidade contra os estágios larvais na concentração de 7,5 µg/mL (EL-BESHBISHI et al., 2019). O potencial moluscicida foi observado na 2-bromo-5-acetoxi-1,4-naftoquinona e 3-bromo-5-acetoxi-1,4-naftoquinona contra *B. glabrata*, a CL₅₀ foi alcançada nas concentração de 0,948 e 0,893 µM, respectivamente (RIBEIRO et al., 2009).

2.8.1 Plumbagina

A naftoquinona plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) (Figura 19), fórmula de C₁₁H₈O₃ e peso molecular de 188,17 g/mol, pode ser isolada dos membros da família Plumbaginaceae, Droseraceae e Ebenaceae. O nome 'plumbagin' é originário do gênero vegetal *Plumbago*, do qual foi isolado pela primeira vez. A plumbagina é encontrada principalmente nas raízes da *Plumbago zeylanica*, mas pode ser encontrada em outras plantas, como *Drosophyllum lusitanicum*, *Drosera natalensis*, *D. capensis* e *D. gigantea*. Estudos têm demonstrado que a Plumbagina possui potencial terapêutico em várias doenças, principalmente no câncer. Além disso, tem sido investigado potencial anti-inflamatório, analgésico, antidiabético, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário. Contudo, o desenvolvimento da plumbagina como alternativa terapêutica enfrenta diversos desafios. O principal é sua

solubilidade limitada e biodisponibilidade oral, que limita sua eficácia, somado a isso, a toxicidade moderada é outra limitação (PANICHAYUPAKARANANT; AHMAD, 2016; THAKOR; JANATHIA, 2022).

Figura 19: Representação da estrutura química da Plumbagina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso: 13/04/2023

O potencial anticancerígeno da plumbagina tem sido investigado por diversos pesquisadores. Estudos relataram que a plumbagina exerce efeitos anticancerígenos significativos *in vitro* por meio de vários mecanismos moleculares, incluindo apoptose, ciclo celular, invasão, metástase, angiogênese e autofagia, através da modulação de vias de sinalização, como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt)/alvo mamífero da rapamicina (mTOR), proteína quinase ativada por AMP (AMPK), Ras, entre outras (LIU et al., 2017; YIN et al 2020). Além da propriedade anticancerígena, a plumbagina demonstrou ter a capacidade de prevenir a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, através da inibição da expressão de TNF- α e TGF- β (MEHDIZADEH et al., 2022).

A plumbagina se mostrou um potente bactericida contra microrganismos multirresistentes, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*. A concentração inibitória mínima (MIC) variou de 0,029 a 0,117 e a concentração bactericida mínima (MBC) de 0,235 a 0,94 $\mu\text{g/mL}$, com 79% a 99% inibição de crescimento e diminuição no desenvolvimento de biofilme (ALFHILI et al., 2022). A plumbagina apresentou

atividade consistente contra 100 isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), incluindo fenótipos multirresistentes, com uma faixa estreita de MIC de 4-8 µg/ml, além de demonstrar efeito sinérgico quando associada ciprofloxacina e piperacilina (PERIASAMY et al., 2019). Ação bactericida contra o *Streptococcus agalactiae* não provocou desenvolvimento de resistência, a MIC da plumbagina foi de 8 mg/L e em análises por microscopia eletrônica evidenciou-se vastas alterações morfológicas e células anormais de *Streptococcus agalactiae* (HUANG et al., 2022).

A ação antimalárica da plumbagina foi promissora *in vitro*, a LC₅₀ foi atingida contra o *P. falciparum* resistentes e sensíveis a cloroquina nas concentrações de 370 e 580 nM, respectivamente (SUMSAKUL et al., 2014). A plumbagina tem a capacidade de inibir tripanotona redutase (TryR), enzima presente na *Leishmania* spp., e outros tripanossomatídeos (SHARMA et al., 2012). Após apenas 3 horas de incubação, o tratamento de vermes adultos de *Paramphistomum cervi* com plumbagina nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL resultou em rápida diminuição da motilidade. Além disso, os vermes tratados com albendazol e plumbagina apresentaram alterações morfológicas semelhantes na superfície tegumentar, incluindo inchaço, formação de bolhas que posteriormente se romperam, erosão e descamação do tegumento (SAOWAKON et al., 2013). Após incubação com 1 µg/mL, a plumbagina reduziu a motilidade de formas imaturas da *Fasciola gigantica* em apenas 1 hora e ocasionou morte de 90% dos vermes em 24 horas (LORSUWANNARAT et al., 2014).

A ação esquistossomicida da plumbagina foi avaliada em um estudo *in vitro* comparativo com o praziquantel. Vermes incubadas na concentração de 10 µg/mL foi possível observar diminuição mais rápida da motilidade em comparação com o praziquantel. Quando incubados em 100 µg/mL, todos os vermes tratados com plumbagina pareciam estar imóveis durante todo o período de observação de 1 a 24 horas, com 91-100% de morte observada, já o praziquantel apresentou mortalidade maior em menor intervalo de tempo. Na microscopia eletrônica de varredura foi observado que a plumbagina causou inchaço, bolhas e rompimento de tubérculos, ocasionando exposição da lâmina basal e descamação do tegumento (LORSUWANNARAT et al., 2012). Em estudo com camundongos, a administração de 20 mg de plumbagin/kg de peso corporal resultou em redução de 64,28% e 59,88% em vermes machos e fêmeas, respectivamente. Além disso, observou-se redução de

69,39%, 68,79% e 69,11% no número de ovos/g de tecido hepático, intestinal e fígado/intestino combinados, respectivamente. O tratamento com plumbagina foi capaz de aliviar a hepatoesplenomegalia, bem como reduzir o tamanho do granuloma hepático e o conteúdo de colágeno hepático em 62,5% e 35,26%, respectivamente (BAKERY et al., 2022).

Por fim, levando-se em consideração a variedade de propriedades farmacobiológicas da plumbagin, o fato de ser um composto de origem natural, o elevado número de casos de esquistossomose, ampla distribuição dos molusco e a necessidade de encontrar novas drogas com atividade moluscicida e apresente baixa toxicidade ambiental. O estudo objetivou encontrar alternativas que possibilitem o controle da esquistossomose, através do combate a cercárias de *S. mansoni* e ao hospedeiro intermediário (*Biomphalaria glabrata*).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade da plumbagina sobre estágios embrionários e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Artemia salina*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade plumbagina sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata*, analisando os parâmetros embrionários (mortalidade e malformações) em diferentes estágios evolutivos (blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage*);
- Avaliar a ação moluscicida da plumbagina sobre caramujos adultos de *B. glabrata*;
- Avaliar a citotoxicidade sobre hemócitos de *B. glabrata* (micronúcleos, binucleadas e outras anomalias hemocitária) após exposição a plumbagina;
- Ensaio do cometa sobre a *B. glabrata* após exposição a plumbagina;
- Avaliar a toxicidade da plumbagina sobre cercárias de *Schistosoma mansoni*.
- Avaliar a toxicidade ambiental da plumbagina sobre *Artemia salina*.

4 METODOLOGIA

4.1 DROGAS E PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DA PLUMBAGINA EM EMBRIÕES DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* E *ARTEMIA SALINA*.

Plumbagina foi obtida da Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA. Inicialmente, para a realização dos ensaios sobre embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*. As doses da plumbagina foram determinadas a partir dos estudos de toxicidade ambiental com *Artemia salina*, através de protocolos estabelecidos no laboratório e com base nos estudos de Martins et al. (2017), Araújo et al. (2018 a, b) e Silva et al. (2019). A niclosamida foi obtida da Baylucide, Bayer®. Todos os reagentes de grau analítico já foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.2 MANUTENÇÃO E OBTENÇÃO DE CARAMUJOS *BIOMPHALARIA GLABRATA* E DA CEPA DE *SCHISTOSOMA MANSONI*.

As sucessivas gerações de colônias de caramujos *B. glabrata* e cepa de *S. mansoni* (BH – Minas Gerais) já são mantidas no moluscário do Departamento de Medicina Tropical - UFPE, no setor de parasitologia. No moluscário, os aquários são subdivididos em infectados e não infectados, os aquários com moluscos infectados são mantidos sob proteção contra luminosidade e elevadas temperaturas, buscando-se evitar liberação de cercárias (forma infectante do homem). Os moluscos são mantidos em tanques plásticos com aproximadamente 20L de água filtrada e decolorada, com pH 7,0 e temperatura de cerca de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ alimentados diariamente com alface orgânica fresca *Lactuca sativa* L. Para garantir a manutenção da cepa, após a troca de água são colocados tiras de plástico e de isopor nos aquários, onde os moluscos realizam a deposição dos seus ovos após a reprodução cruzada nesses materiais. Em seguida, os ovos foram coletados e reservados em aquários menores, chamados de berçários. Os ovos eclodem em torno de 7 dias e ficam nos berçários sendo alimentados até atingirem idade adulta. A cepa de *S. mansoni* mantida no departamento é obtida através da passagens sucessivas em caramujos *B. glabrata* e

camundongos *Swiss Webster* alojados no biotério do Instituto de Immunopatologia Keizo Asami (iLIKA) da UFPE.

4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*.

Embriões (n=100) em estágios de blástula (0^a a 15^a h após a primeira clivagem mitótica), gástrula (24^a a 39^a h), trocófora (48^a a 78^a h), véliger (96^a a 120^a h) e *hippo stage* (144^a - 168^a h) foram expostos durante 24 h a plumbagina em concentrações de 0,3 - 2 µg/mL em placas de 24 poços. Foram realizados dois grupos controle, o primeiro com apenas água filtrada decolorada e o segundo grupo controle com dimetilsufóxido (DMSO) a 0,5% diluído em água filtrada. Após a exposição os embriões foram lavados e transferidos para novas placas com água filtrada decolorada, onde foram monitorados durante 8 dias ou até a eclosão de todos os caramujos do grupo controle negativo para serem avaliados quanto a sua viabilidade (vivos) e inviabilidade (malformados e mortos). Os experimentos foram realizados em triplicata e todo procedimento experimental foi de acordo com estudos de Araújo et al. (2018a).

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CARAMUJOS ADULTOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*.

Caramujos adultos (n=10) medindo entre 10 - 14 mm de diâmetro de concha, entre 2 - 3 meses de idade e verificados em relação a maturidade sexual através da deposição de desovas, foram expostos a plumbagina durante 24 h 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 foram lavados e analisados durante 07 dias e a taxa de mortalidade, fecundidade e fertilidade foram registradas diariamente (WHO, 1965). Caramujos com ausência de movimento, ausência de batimentos cardíacos, retração na concha ou liberação de hemolinfa foram considerados mortos. O grupo controle negativo foi realizado nas mesmas condições apenas com água filtrada decolorada. A niclosamida (Baylucide, Bayer) foi utilizada para o controle

positivo, na concentração de 1 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (SILVA et al., 2019).

4.5 ANÁLISES DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ANOMALIAS NUCLEARES NOS HEMÓCITOS DE CARAMUJOS ADULTOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* EXPOSTOS A PLUMBAGIN.

As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos estabelecidos por Lima et al. (2019). Caramujos (n=10) foram expostos por 24 h a plumbagina em diferentes concentrações (2; 2,5; 3 e 3,5 µg/mL). Após a exposição os caramujos foram mantidos em aquários com água filtrada e declorada com pH = 7,0 por mais de 24 h. Selecionamos 4 indivíduos de cada grupo aleatoriamente para posterior análise morfológica e quantitativa de hemócitos (Pavlica et al., 2000). Em seguida, 100 µL de hemolinfa foi coletado e colocado em lâminas de microscopia óptica. Logo após, 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 e coradas com Giemsa, e posteriormente lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente e avaliadas através de análise em microscópio óptico em objetiva de 100x. Para cada concentração foram feitas 4 lâminas. Foram observados hemócitos (n = 1000/lâmina) e a frequência das alterações hemocitárias; micronúcleos, binucleados, além de hemócitos com apoptose.

4.6 ENSAIO COMETA

O ensaio do cometa foi realizado como descrito por Singh et al. (1988), com modificações. Caramujos com 10-14mm de diâmetro foram expostos a plumbagina em diferentes concentrações por 48h, após 24 h do final da exposição foi feita a coleta de hemolinfa de 10 caramujos de cada grupo coleta através de micropipeta. Foram

analisados possíveis danos ao DNA causados pela plumbagina foram averiguados por ensaio de eletroforese em gel de célula única de acordo com metodologia adaptada de acordo com Grazeffe et al. (2008). Três lâminas de microscópio 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. Cerca de 100 μL de hemolinfa foram dissolvido em 500 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. 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, sarcosinato de sódio 1%, Triton X-100 1% e sulfóxido de dimetil 10% (DMSO), a 4°C overnight. 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 30 minutos para permitir o desenrolar do DNA e a exposição de locais danificados. Para eletroforese do DNA, foi aplicada uma corrente elétrica de 25 V (0,86 V / cm) e 300 mA por 20 min. 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, fixadas com etanol absoluto por 10 min e coradas com 100 μL de brometo de etídio (20 mg/mL). De cada lâmina, 100 células foram examinadas visualmente e a porcentagem de DNA de hemócitos danificados foi avaliada (LEE; STEINERT, 2003).

4.6.1 Análise por microscopia de fluorescência

As lâminas foram coradas com 50 mL de uma solução de SYBR safe (Invitrogen) (1: 500). Cem células por animal (*B. glabrata*) foram analisadas sob ampliação de 400 × em um microscópio de fluorescência (Nikon H550L) com um filtro de excitação de 450 - 490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. A análise visual do dano ao DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Collins et al. (2008). Os nucleoides foram divididos em 5 categorias de dano ao DNA (0 - 4), dependendo da extensão do dano. A categoria 0 indica que não houve danos, enquanto as categorias 1 a 4 indicam níveis crescentes

de danos ao material genético. Para avaliar o grau de dano ao DNA, o índice de danos (ID) foi utilizado como parâmetro. O ID será calculado de acordo com a fórmula: $ID = 0 \text{ (grau de dano 0)} + 1 \text{ (grau de dano 1)} + 2 \text{ (grau de dano 2)} + 3 \text{ (grau de dano 3)} + 4 \text{ (grau de dano 4)}$.

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*.

Caramujos adultos (n=15) de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* foram expostos por 2 h a luz artificial para liberação de cercárias. Aproximadamente cem cercárias foram expostas a 1 mL de solução com plumbagina nas diferentes concentrações 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 µg/mL (28° C ±3). Os critérios de avaliação foram através de 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), para determinar as doses-resposta com resultados expressos em: ausência de morte (-), menos de 50% de morte (+), superior a 50% de morte (++) e 100% de mortalidade (+++). O grupo controle foi realizado nas mesmas condições apenas com água filtrada decolorada. A niclosamida (Baylucide, Bayer) foi utilizada para o controle positivo, na concentração de 1 µg/mL (Araújo et al., 2018c,d; Silva et al., 2018a,b). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE 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 e aeração constante em temperatura de 25 °C por 48 h, tempo para eclosão. Em seguida, larvas de *A. salina* foram separadas em grupos (n=10) e submetidas às concentrações 0,5; 1; 1,5; 2; 2,25; 2,5 e 3 µg/mL da plumbagina incubadas em água do mar, por 24 h na mesma temperatura. Controles negativos foram realizados com água do mar e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.5% diluído em água do mar. O controle positivo foi realizado com niclosamida a 1 µg/mL. Os testes foram realizados em quadruplicatas

e a avaliação da mortalidade e sobrevivência das larvas foram realizadas através de um microscópio estereoscópico (ARAÚJO et al., 2018b).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média $\pm$ 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 Tukey foi usado para identificar a diferença entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

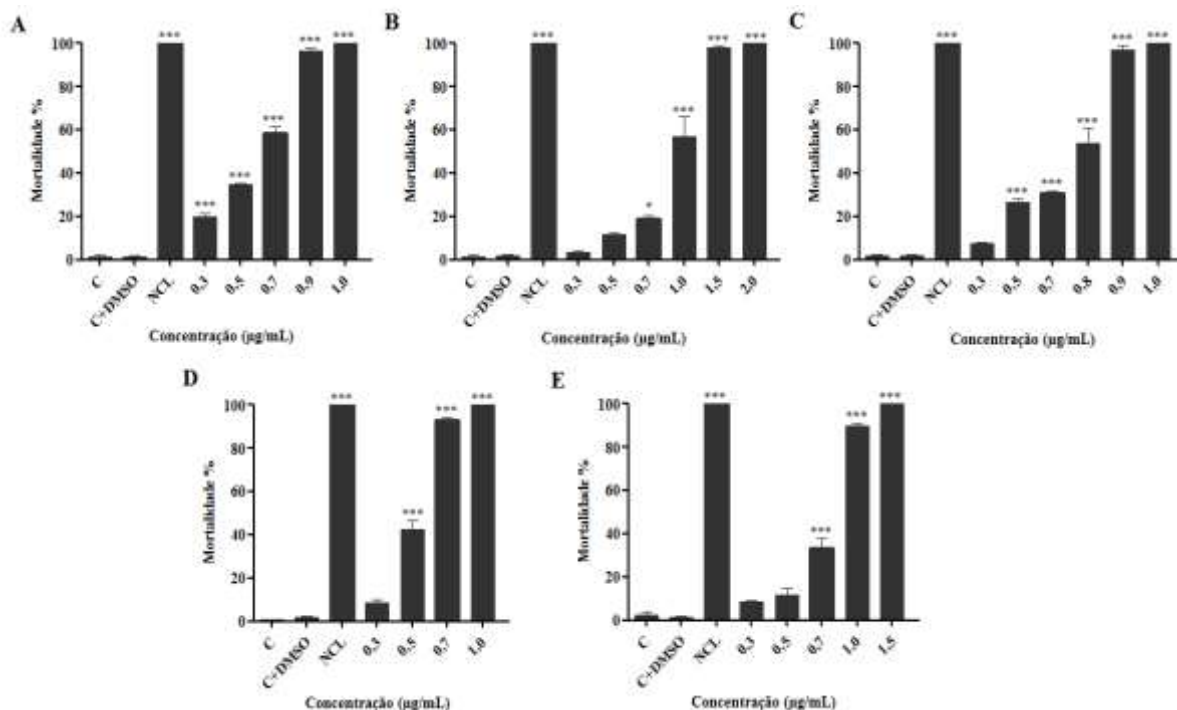
5.1 TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*.

A plumbagina apresentou uma atividade significativa sobre os embriões da *B. glabrata* em todos os estágios evolutivos (Figura 20 A-E), em baixas concentrações conforme preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1965) demonstrando ser um moluscicida eficiente e promissor.

O estágio de blástula nas concentrações de 0,3 e 0,7 µg/mL apresentou 20 e 57% de inviabilidade, respectivamente, sendo resultados semelhantes em gástrula nas concentrações de 0,7 e 1 µg/mL. O percentual de inviabilidade vista em trocófora nas concentrações de 0,8 e 0,9 µg/mL foram 54 e 97% respectivamente, enquanto véliger apresentou 42 e 93% nas concentrações de 0,5 e 0,7 µg/mL respectivamente. Por fim, *hippo stage* apresentou 33 e 90% de inviabilidade nas concentrações de 0,7 e 1 µg/mL.

O estágio embrionário de gástrula foi o menos suscetível a plumbagina alcançando os 100% de inviabilidade (mortes e malformações) em 2 µg/mL (Figura 20-B), enquanto, para os demais estágios embrionários o mesmo percentual de inviabilidade foi observado entre as concentrações de 1 e 1,5 µg/mL (Figura 20 A, C, D e E). Resultados semelhantes foram observados com os testes de toxicidade sobre embriões de *Physa acuta* (molusco) (LI et al., 2014), *Rana nigromaculata* (rã), (LI et al., 2009) e *Carassius auratus* (peixe) (WANG et al., 2010) para o brometo 1- octil-3- metilimidazólio, e sobre os embriões da *B. glabrata* expostos ao usnato de potássio (ARAÚJO et al., 2018a) e ao extrato etéreo de *Ramalina aspera* (SILVA et al., 2019) derivados de líquens, onde os embriões nos estágios evolutivos iniciais foram menos susceptíveis aos agentes moluscicidas.

Figura 20: Toxicidade da plumbagina sobre os estágios embrionários da *B. glabrata*.



Legenda: Blástula (A), gástrula (B), trocófora (C), véliger (D) e *hippo stage*(E). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o controle negativo com DMSO (C+DMSO), controle positivo com niclosamida (NCL).

As alterações morfológicas da atividade embriotóxica da plumbagina sobre os estágios embrionários da *B. glabrata* são apresentados na figura 21. Dentre os efeitos tóxicos e teratogênicos observamos embriões mortos, com atraso no desenvolvimento e hidrópicos, sendo esta última alteração a mais observada dentre os embriões malformados (Figura 21 K-O). Efeitos semelhantes foram observados quando diversos compostos naftoquinônicos foram testados contra embriões de *Biomphalaria glabrata* na fase de blástula (Santos et al., 2020). A ação de novos compostos impedindo a eclosão dos caramujos ou causando mutações são importantes, pois agem reduzindo a capacidade reprodutiva da espécie e por consequência reduzem a população (Araújo et al., 2020; Santos et al., 2020). A exposição à niclosamida foi 100% letal para todos os estágios embrionários, sendo observado apenas mortes. (Figura 21 F-J).

Figura 21: Embriões de *B. glabrata* expostos à água (controle negativo), à niclosamida (controle positivo) e à plumbagin.



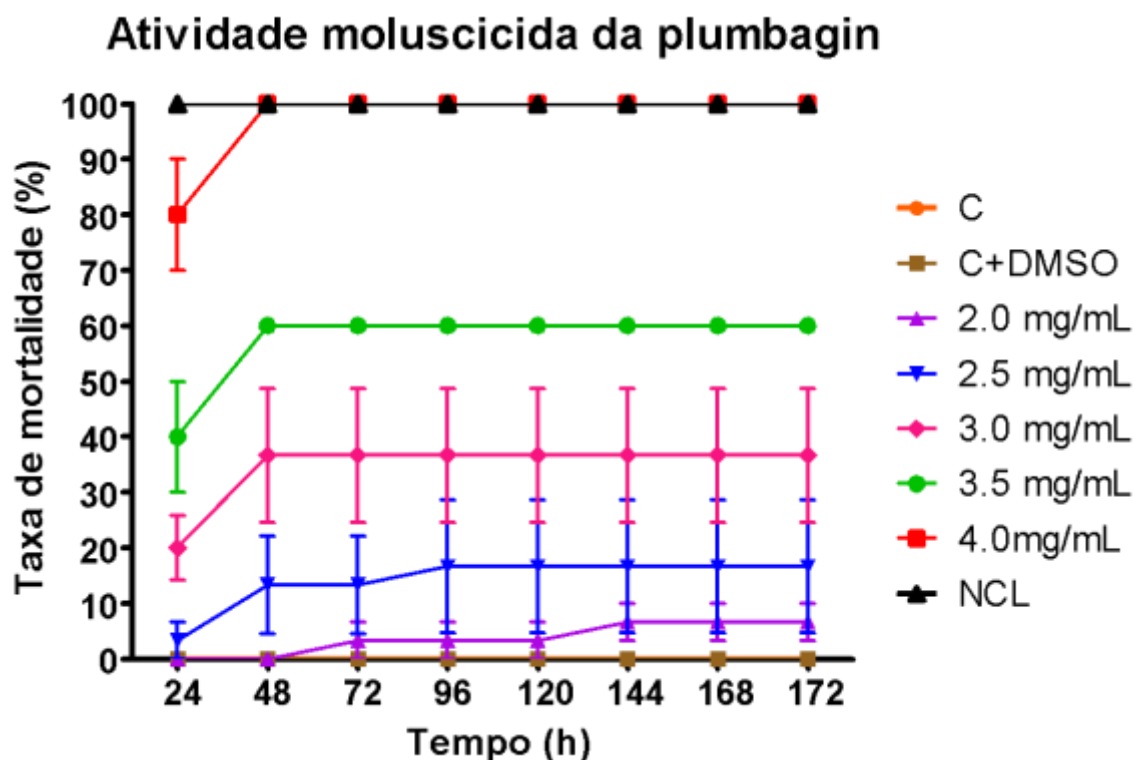
Legenda: Embriões expostos à água (A-E), à niclosamida (1 µg/mL) (F-J) e diferentes concentrações da plumbagina (K-O). A, F e K - estágio de blástula (concentração de 0,9 µg/mL), B, G e L - estágio de gástrula (concentração de 1,5 µg/mL), C, H, e M - estágio de trocófora (concentração de 0,8 µg/mL), D, I e N - estágio véliger (concentração 0,7 µg/mL) e E, J e O - estágio *hippo stage* (concentração 1,0 µg/mL). Alterações morfológicas dos embriões-1: embrião saudável; 2: embrião morto; 3: embrião hidrópico; 4: atraso de desenvolvimento.

5.2 TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE OS CARAMUJOS ADULTOS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA*.

Na concentração de 2 µg/mL, observou-se pouco efeito, com apenas 6.66% de letalidade em 172 horas. Já na concentração de 2,5 µg/mL apresentou 3%, 13% e 17%, de mortalidade em 24, 48 e 172 horas respectivamente. As concentrações de 3, 3.5 e 4 µg/mL causaram letalidade de 20%, 40% e 80%, respectivamente em 24 horas, e 37%, 60% e 100% de 48 horas em diante (Figura 22). Aumento na produção de muco, retração da concha, liberação de hemolinfa e letargia foram observados nos caramujos expostos a maiores concentrações.

Em estudos El-beshbishi et al. (2015) foi apresentado a ação de naftoquinona em conjunto com artemisinina sobre caramujos de *B. alexandrina*, 100% de mortalidade foi alcançada na concentração de 40 µg/mL em 24 h de exposição. El-beshbishi et al. (2019) analisou a ação moluscicida da artemisina-naftoquinona sobre *Bulinus truncatus*, a concentração de 20 ppm resultou em mortalidade total no intervalo de 24 h. Santos et al. (2020) em estudos com naftoquinonas demonstraram liberação de hemolinfa em altas doses, indicando a quebra da membrana externa. As dosagens utilizadas neste trabalho foram inferiores às aplicadas em experimentos com outras naftoquinonas, indicando uma maior eficiência ao alcançar 100% de letalidade na concentração de 4 µg/mL em 48 horas após a exposição, possibilitando também menores efeitos ao ambiente.

Figura 22: Toxicidade da plumbagina sobre caramujos adultos de *B. glabrata* durante 8 dias após exposição.



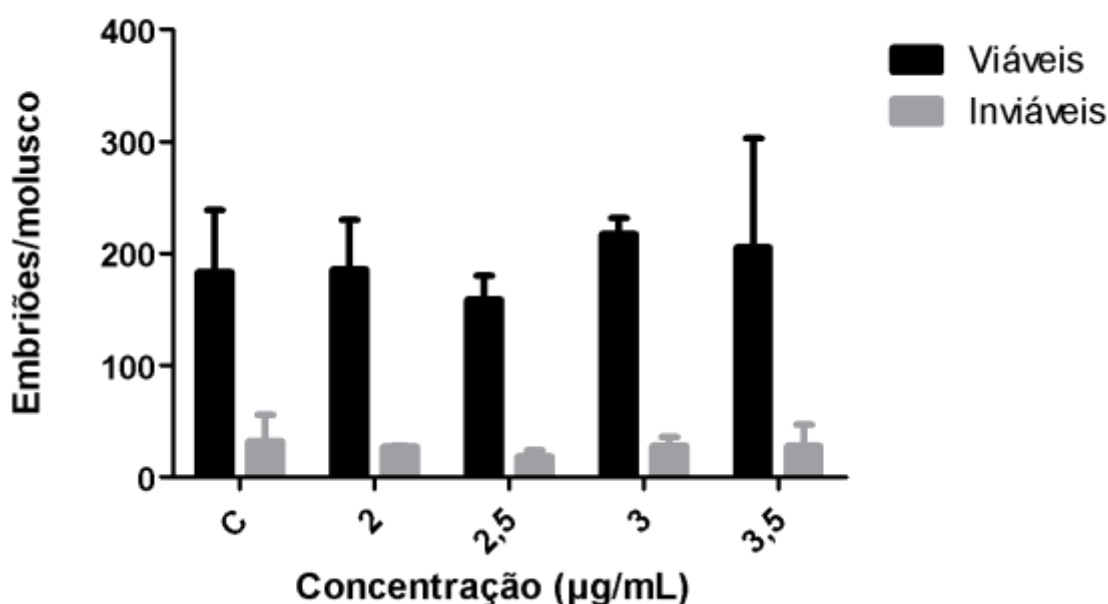
Legenda: C1: Água. C2: Água + DMSO 0,5%. NCL: Niclosamida. Concentrações de plumbagina em µg/mL.

5.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE FECUNDIDADE E FERTILIDADE DOS CARAMUJOS ADULTOS EXPOSTOS A PLUMBAGIN.

A análise da fecundidade e fertilidade dos caramujos expostos a possíveis novos candidatos a drogas com ação moluscicidas é essencial, porque caso um caramujo sobreviva ele é capaz de colonizar aquele ambiente novamente (TELES et al., 2008). A figura 23 expõem os resultados obtidos após a análise de fecundidade e fertilidade dos caramujos expostos a plumbagin, no intervalo de 8 dias de observação. Foram observadas diferenças significativas na quantidade de embriões depositados pelo mesmo grupo em diferentes dias. Após 24 horas de exposição, houve poucos embriões depositados, mas a partir de 48 horas, ocorreu certa recuperação. Apenas o grupo exposto a 2,5 µg/mL de plumbagina mostrou redução no número de embriões depositados em comparação ao grupo controle, e não foi possível determinar se a

plumbagina afeta a fecundidade dos caramujos, pois o próprio grupo controle apresentou variações consideráveis entre os dias de análise. Quanto à viabilidade dos embriões (fertilidade), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos expostos à plumbagina e o grupo controle. Diferentemente de outras naftoquinonas relatadas em estudos de Alberto-Silva et al. (2020) a plumbagina não apresentou capacidade de alterar os parâmetros relatados.

Figura 23: Embriões depositados pelos caramujos nos 8 dias de observação após a exposição à plumbagin.



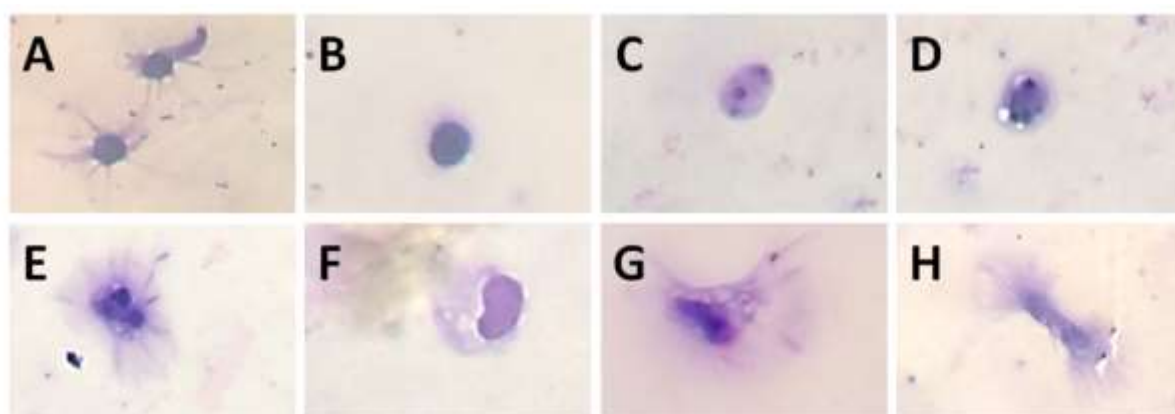
Legenda: C: Água. Em preto: embriões viáveis. Em cinza: embriões inviáveis. Concentrações de plumbagina em µg/mL.

5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DE APOPTOSE, BINUCLEAÇÃO E MICRONÚCLEOS NOS HEMÓCITOS.

Os hemócitos participam do sistema imunológico dos caramujos, sendo a principal linha de defesa. Análises de micronúcleos e outras anomalias nucleares nos hemócitos de caramujos adultos de *B. glabrata* expostos a plumbagina foram utilizado com o objetivo de avaliar danos causados ao material genético, a técnica de micronúcleo se apresenta como um ótimo indicador para demonstrar ação de agentes

mutagênicos e genotóxicos (IBRAHIM et al., 2018). A observação citomorfológica dos hemócitos de *B. glabrata* revelou predominantemente dois tipos de células: granulócitos (Figura 24-A) que são células em forma de estrela com pseudópodos projetados, e hialinócitos (Figura 24-B) que possuem uma maior relação núcleo/citoplasma e um citoplasma homogêneo sem grânulos. A plumbagina causou alterações citomorfológicas em todas as concentrações testadas, com apoptose (Figura 25-B), binucleação (Figura 25-C) e micronúcleo (Figura 25-D) sendo as mais frequentes. Ocasionalmente, hialinócitos com núcleos descondensados e citoplasmas pouco visíveis (Figura 24-C), hialinócitos com vacúolos citoplasmáticos (Figura 24-D), células trinucleadas (Figura 24-E), células com núcleos reniformes (Figura 24-F) e células unidas (Figura 24-H) foram observadas com baixa frequência.

Figura 24: Hemócitos de *B. glabrata* após exposição à plumbagin.

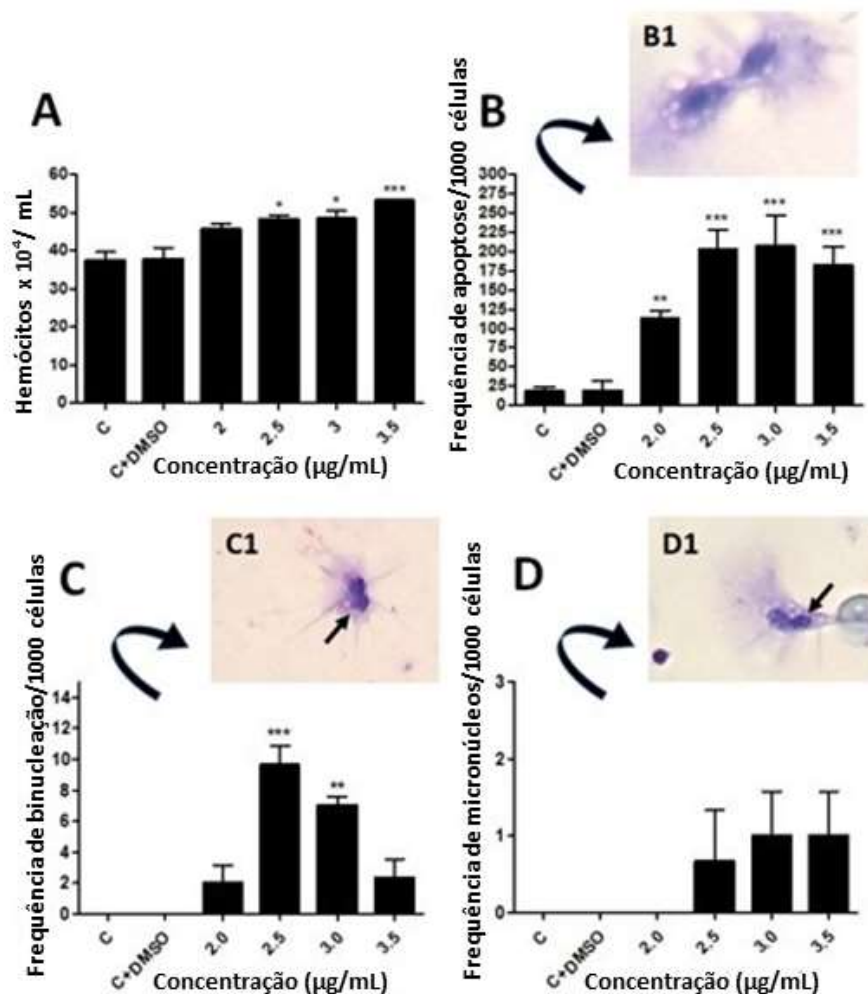


Legenda: Hemócitos granulócitos (A), hemócito hialinócito (B), hemócito hialinócito com núcleo descondensado e citoplasma não visível (C), hemócito hialinócito com vacúolos (D), hemócitos granulócitos trinucleado (E), hemócito hialinócito com núcleo em forma de rim (F), hemócito granulócitos binucleado em apoptose (G) e hemócitos granulócitos em apoptose unidos (H).

Na Figura 24 é possível observar as alterações analisadas, a mais frequente após exposição a plumbagina foi a presença de células apoptóticas, nas concentrações 2; 2,5; 3 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ foi demonstrada a presença de aproximadamente 113, 160, 207 e 128 células apoptóticas por 1000 células, respectivamente (Figura 24-B). Foi observado aproximadamente 1 micronúcleo a cada 1000 células analisadas nas concentrações de 2,5; 3 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$. Ao se analisar presença de binucleações foi encontrado aproximadamente 2, 7, 7 e 1 por 1000 células, nas concentrações 2; 2,5;

3 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 24-C). Foi observado aproximadamente 1 micronúcleo a cada 1000 células analisadas nas concentrações de 2,5; 3 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25-D). Resultados semelhantes foram observados ao utilizar outra substância natural em estudos de Araújo et al. (2021) analisando a presença de células apoptóticas após exposição ao usnato de potássio. Silva et al. (2019) demonstrou efeito semelhante ao utilizar o extrato de *Ramalia aspera*. Estudos de Tripathi et al. (2019), demonstraram a atividade apoptótica da plumbagina em células cancerígenas em ratos e humanos, sendo uma alternativa promissora no tratamento do câncer.

Figura 25: Análise das alterações morfológicas em hemócitos (1000 cels) de *B. glabrata* exposto a diferentes concentrações da plumbagina.



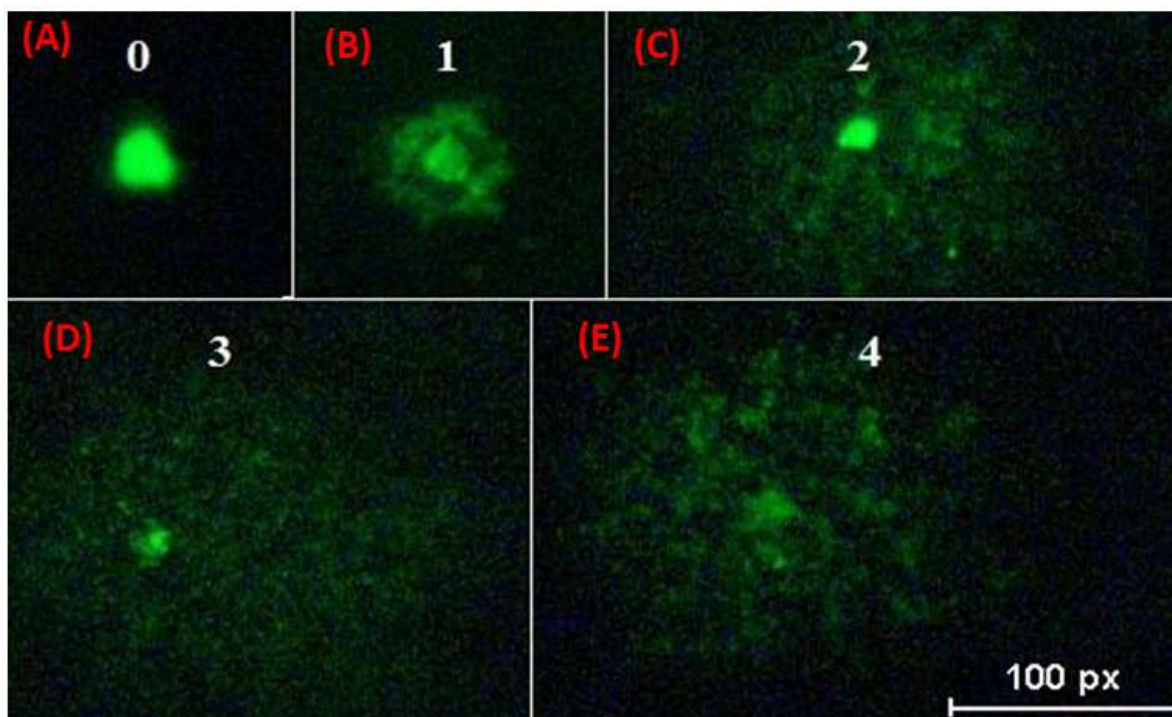
Legenda: Contagem de hemócitos/mL de hemolinfa (A), Número de apoptose por 1000 células analisadas (B), número de binucleação (seta) por 1000 células analisadas (C), número de micronúcleos (seta) por 1000 células analisadas (D). C:

Água filtrada e decolorada. C+DMSO: 0,5% DMSO em filtrado e água decolorada. Resultados expressos em média e desvio padrão (DP). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com o controle negativo C+DMSO. Concentrações de plumbagina em $\mu\text{g/mL}$.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ALTERAÇÕES NO DNA POR MEIO DE ENSAIO COMETA.

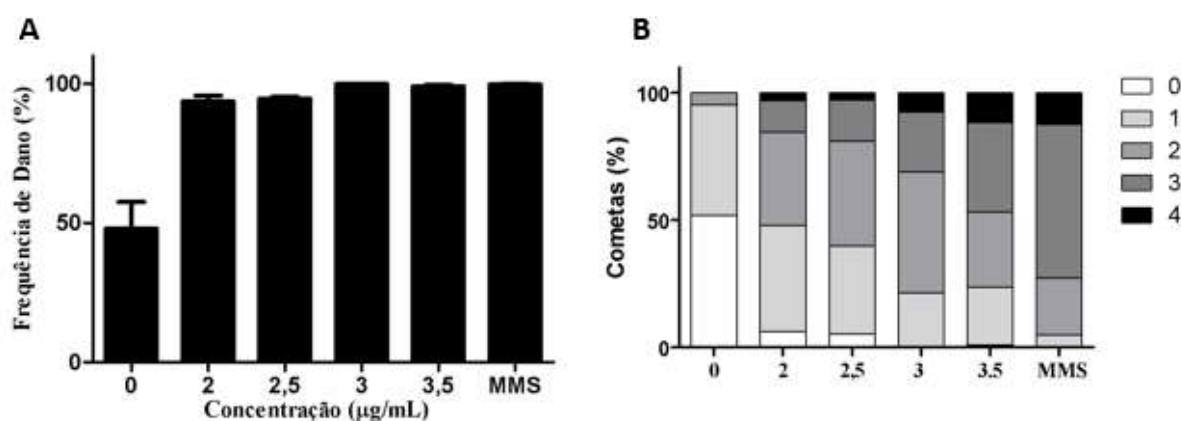
A presença da migração do DNA nas células em um gel submetido a uma eletroforese, é um dos biomarcadores relacionados à genotoxicidade (de ALBUQUERQUE MELO et al., 2019). Se não houver dano é exibido homogeneamente formando um círculo, como é possível observar no item A na Figura 26. Caso apresente dano, o DNA se apresenta de forma fragmentada, formando uma espécie de cauda de cometa, nos itens B, C, D e E indicando o grau de dano 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Figura 26: Avaliação do grau de dano ao DNA de células da espécie *B. glabrata* após exposição a plumbagina.



Legenda: O índice de danos (ID) foi utilizado como parâmetro. ID = 0 (grau de dano 0, DNA íntegro), ID = 1 (grau de dano 1), ID = 2 (grau de dano 2), ID = 3 (grau de dano 3), ID = 4 (grau de dano 4, indicando dano máximo).

Figura 27: Danos ao DNA de hemócitos de *B. glabrata* determinados pelo ensaio cometa.



Legenda: Foram analisados 500 núcleos por grupos. Em A: Índice de dano (ID). Em B: Distribuição percentual de dano por concentração em µg/mL da plumbagin. C: Água filtrada e decolorada, C + DMSO: 0,5% de DMSO em água filtrado e decolorada, MMS: Metanossulfonato de metila. O resultado foi expresso como média ± desvio padrão da média. **P < 0,01; ***P < 0,001 em comparação com o controle negativo C + DMSO.

O dano ao DNA de *B. glabrata* exposto a plumbagina foi dependente da concentração (Figura 27), como demonstrado nos estudos de Siqueira et al. (2020, 2021) ao avaliar a exposição de *B. glabrata* a produtos químicos tóxicos. Em relação às quinonas, Osman et al. (2004) ao avaliar a exposição de *Dreissena polymorpha* (mexilhões) à menadiona e à lawsona relataram toxicidade e danos ao DNA do molusco. Esses autores relatam que os danos causados por quinonas ao DNA de moluscos ocorrem a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Seguindo o que foi proposto por Osman e outros pesquisados, além ter como base os danos observados nos núcleos dos hemócitos, muito semelhante ao que ocorre após a exposição aos radicais livres, sugerimos que o efeito moluscicida da plumbagina se deriva do seu potencial redutor capaz de formar EROS, causando danos DNA. Esta hipótese é apoiada por outros estudos onde plumbagina exerceu sua atividade através do desequilíbrio oxi-redox (OSMAN et al., 2004; SHANG et al., 2012; TSAO et al., 2020).

5.6 TOXICIDADE DA PLUMBAGINA SOBRE CERCÁRIAS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*.

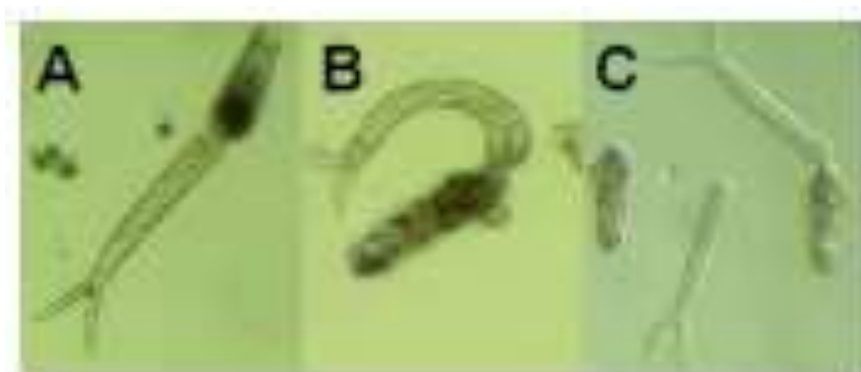
Na tabela 1 é demonstrado os resultados da atividade cercaricida da plumbagina em intervalos de 15, 30, 60 e 120 minutos de exposição. Na concentração de 1 µg/mL observou-se a divisão entre a cauda e o corpo cercariano em 60 minutos de exposição e em 120 minutos apresentou 100% de mortalidade. Em 15 min, a concentração de 2 µg/mL causou movimentos atípicos nas cercárias, já a concentração de 2,5 µg/mL resultou em alterações no padrão de locomoção e divisão da cauda e corpo cercariano (Figura 28). Na concentração de 3 µg/mL, após 15 minutos, as ventosas das cercárias estavam aderidas à placa com pouco ou ausência de movimento nas caudas, também foi observado separação entre a cauda e o corpo cercariano. Nas concentrações de 1,5; 2; 2,5 e 3 µg/mL houve 100% de letalidade em 60 minutos. As cercárias dos grupos controles 1 e 2 apresentaram normalidade através da observação de movimentação por rotação e vibração com integridade física preservada, contudo no controle positivo com a niclosamida observou letalidade de 100%.

Tabela 1: Ação da plumbagina sobre cercárias de *S. mansoni* por tempo de exposição em minutos.

Grupos experimentais (µg/mL)	Tempo de exposição (minutos)			
	15 min	30 min	60 min	120 min
C1	-	-	-	-
C2	-	-	-	-
1	-	-	+	+++
1,5	-	-	+++	+++
2	-	-	+++	+++
2,5	-	-	+++	+++
3	-	-	+++	+++
NCL	+++	+++	+++	+++

Legenda: C1: Água. C2: DMSO 0,5%. NCL: Niclosamida. Concentrações da plumbagina em $\mu\text{g/mL}$

Figura 28: Cercárias de *Schistosoma mansoni*, controle negativo (A), controle positivo (B) e plumbagina (C).



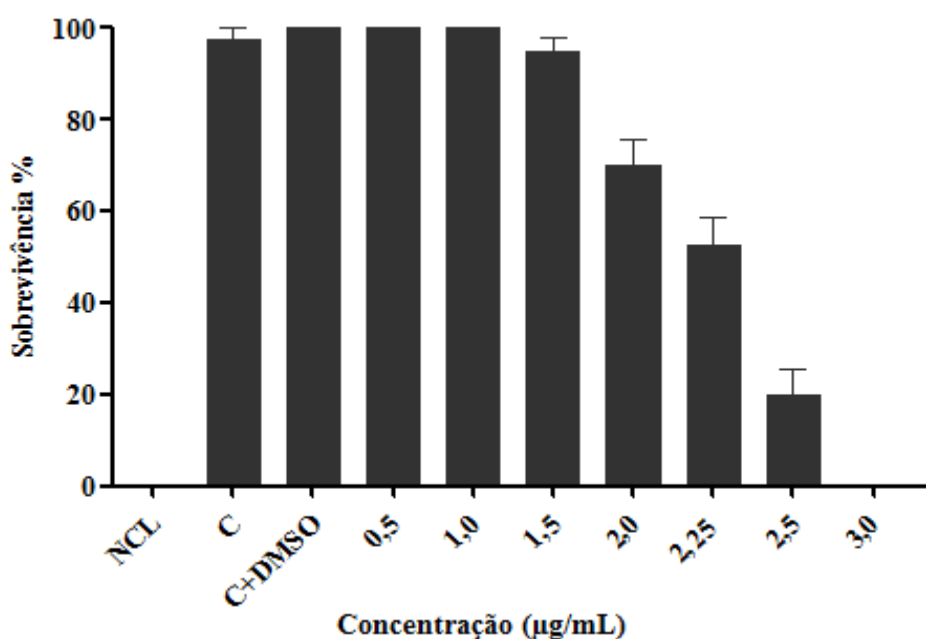
Legenda: Cercárias expostas a 0,5% de solução DMSO em água filtrada (C+DMSO) (A), cercárias expostas a 1 $\mu\text{g/mL}$ de niclosamida com corpo granular e cauda contraída (B), cercárias expostas a 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de plumbagina por 15 minutos, destacando a retração do corpo e cauda cercária, além da separação entre a cauda e o corpo cercariano (C).

A ação cercaricida em um composto é essencial, um caramujo possui a capacidade de liberar centenas de cercárias no ambiente aquático, as cercárias permanecem viáveis por até 72 h (COLLEY et al., 2014). Em estudos El-Beshbishi et al. (2015, 2019) avaliou o potencial esquistossomicida da artemisinina-naftoquinona fosfato, que apresentou boa ação cercaricida contra cercárias de *S. mansoni* e *S. haematobium* com 100% de letalidade em 15 minutos na dose de 16,8 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No intervalo de 70 minutos, 100% de letalidade foi alcançada na concentração de 0,94 $\mu\text{g/mL}$ para *S. haematobium*, com destaque a elevada percentagem de ruptura do corpo cercariano. Os resultados apresentados no presente estudo estão em consonância com estudos anteriores de Zhang e Coultas em 2013, onde a plumbagina foi testada contra cercárias de *S. mansoni*. A plumbagina apresentou uma forte ação cercaricida semelhante aos outros compostos analisados, porém causou uma maior porcentagem de separação entre corpo cercariano e cauda, pois ao invés de paralisar as cercárias, a droga provoca contrações musculares (Zhang; Coultas, 2013).

5.7 ANÁLISE DA TOXICIDADE AMBIENTAL DA PLUMBAGINA SOBRE O BIOINDICADOR, *ARTEMIA SALINA*.

A plumbagina demonstrou ser um moluscicida eficaz, seu desenvolvimento como possível método de controle da esquistossomose através do controle populacional dos moluscos *B. glabrata* deve avaliar a extensão dos possíveis efeitos colaterais ambientais. Como base neste cenário, se faz necessário a avaliação ecotoxicológica com bioindicador de referência (LECHUGA et al., 2016). Um importante componente de monitoramento é a espécie *Artemia salina*, cuja sobrevivência após o contato com o agente testado é frequentemente utilizada como medida de efeitos tóxicos ambientais (OLIVEIRA et al., 2011; GAMBARDELLA et al., 2015). Na Figura 29 é observado o percentual de sobrevivência da *A. salina* após a exposição a plumbagin. As três primeiras concentrações avaliadas não apresentaram ecotoxicidade significativa sobre as *A. salina*, enquanto, a concentração de 2 µg/mL apresentou uma mortalidade de 30%.

Figura 29: Sobrevivência do bioindicador ambiental *Artemia salina* após exposição a plumbagina.



Legenda: Controle niclosamida (NCL) 1 µg/mL, controle (C): somente água, controle 0,5% DMSO (C+DMSO) e concentrações da plumbagin.

A nível de comparação entre o efeito tóxico da niclosamida com o da plumbagina, o agente avaliado (plumbagin) causou uma mortalidade significativamente menor sobre o biondicador ambiental na concentração de 2 µg/mL, maior concentração necessária para causar 100% de inviabilidade contra embriões em estágio de gástrula, como visto anteriormente. Por outro lado, para a niclosamida foi observada uma letalidade (100%) na concentração de 1 µg/mL. Embora provoque um considerável impacto ambiental devido a sua ação inespecífica, a niclosamida ainda é considerada entre os métodos mais eficazes no controle da esquistossomose mansônica, demonstrando que é um moluscicida eficaz, ainda assim alternativas menos letais, como a plumbagina pode trazer vantagens por apresentarem menos dano ao meio ambiente (KING; SUTHERLAND; BERTSCH, 2015; SOKOLOW et al., 2016).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram o potencial moluscicida da plumbagina da *Biomphalaria glabrata*. A plumbagina apresentou efeitos tóxicos contra os estágios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e *hippo stage* da *B. glabrata*, somada a atividade tóxica, teratogênica, citotóxica e genotóxica contra os caramujos adultos. Além disso, a plumbagina causou mortes das cercárias de *Schistosoma mansoni*. Portanto pode-se sugerir que a plumbagina seja utilizada como ferramenta alternativa no controle populacional do vetor em concentrações ecologicamente seguras, sendo alternativa no combate à esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T.W.A.; BATISTA, J.J.; FERREIRA, S.A.O.; SAMPAIO, M.V.L.; PEREIRA, D.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; MELO, A.M.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A.L.; ARAÚJO, H.D.A.; COELHO, L.C.B.B. Effect of *Bauhinia monandra* Kurz Leaf Preparations on Embryonic Stages and Adult Snails of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Schistosoma mansoni* Cercariae and Toxicity in *Artemia salina*. **Molecules**. 2022 Aug 5;27(15):4993. doi: 10.3390/molecules27154993.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**. 2014b Feb 15;21(3):261-7. doi: 10.1016/j.phymed.2013.08.012.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C.; SILVA, R. A.; BARBOSA, V.X.; GÓES, A. J.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M.; ALBUQUERQUE, M. C. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental Parasitology**. 2014a Jul;142:83-90. doi: 10.1016/j.exppara.2014.04.010.
- ALBERTO-SILVA, A. C. et al. Behavioral response of *Biomphalaria glabrata* exposed to a sublethal concentration of *Euphorbia milii* var. *Hislopia latex*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, p. 1–10, 2020.
- ALFHILI, M.A.; AHMAD, I.; ALRAEY, Y.; ALANGARI, A.; ALQAHTANI, T.; DERA, A.A.; Antibacterial and anti-biofilm activity of plumbagin against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. **Saudi Med J**. 2022 Nov;43(11):1224-1233. doi: 10.15537/smj.2022.43.11.20220446.
- ARAGON, A.D.; IMANI, R.A.; BLACKBURN, V.R.; CUPIT, P.M.; MELMAN, S.D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E.S.; CUNNINGHAM, C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Mol Biochem Parasitol**. 2009 Mar;164(1):57-65. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.007. Epub 2008 Nov 28.
- ARAÚJO, P.S.; CAIXETA, M.B.; BRITO, R.D.S.; GONÇALVES, B.B.; DA SILVA, S.M.; LIMA, E.C.O.; SILVA, L.D.; BEZERRA, J.C.B.; ROCHA, T.L. Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: Implications for control of intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**. 2020 Nov;211:105644. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105644.
- ARAÚJO, H. D. A.; SILVA, L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S. M.; SILVA, N. H.; MELO, A. M. M. A.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, V. L. M. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**. 2018a Mar;179:39-43. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.007.
- ARAÚJO, H. D. A.; SILVA, L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S. F.; SILVA, N. H.; MELO, A. M. M. A.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, V. L. M. Dataset on usnic acid from *Cladonia substellata* Vainio (Lichen) schistosomiasis mansoni's vector control and

environmental toxicity. **Data in Brief.** 2018b Jan 3;17:288-291. doi: 10.1016/j.dib.2017.12.068.

ARAÚJO, H. D. A.; SILVA L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S. F.; SILVA, N. H.; MELO, A. M. M. A.; MARTINS, M. C. B.; LIMA, V. L. M. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Trop.** 2018c Dec;188:132-137. doi: 10.1016/j.dib.2017.12.068.

ARAÚJO, H. D. A.; MELO, A. M. M. A.; SIQUEIRA, W. N.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A. L.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; SILVA, N. H. D.; LIMA, V. L. M. Dataset on schistosomiasis control using potassium usnate against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stage and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Data in Brief.** 2018d Oct 27;21:1347-1351. doi: 10.1016/j.dib.2018.10.119.

Araújo, H. D. A.; Silva, H. A. M. F.; Siqueira, W. N.; Santos, V. H. B.; Lima, M. V.; Júnior, J. G. S.; Silva, N. H.; Albuquerque, M. C. P. A.; Melo, A. M. M. A.; Aires, A. L.; Coelho, L. C. B. B. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) infected and not infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.** 2021 Oct; 222:106067. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106067.

AUSTIN, F.G.; FRAPPAOLO, P.J. *Schistosoma mansoni*: chemoprophylaxis studies with antipenetration compounds. **Am J Trop Med Hyg.** 1973 Nov;22(6):743-7. doi: 10.4269/ajtmh.1973.22.743.

BAKERY, H.H.; ALLAM, G.A.; ABUELSAAD, A.S.A.; ABDEL-LATIF, M.; ELKENAWY, A.E.; KHALIL, R.G. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-fibrotic and schistosomicidal properties of plumbagin in murine schistosomiasis. **Parasite Immunol.** 2022 Nov;44(11):e12945. doi: 10.1111/pim.12945.

BARBOSA, C. S.; FAVRE, T. C.; AMARAL, R. S.; PIERI, O. S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, p. 393 – 418, 2008.

BARBOSA, C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, E. S.; ARAÚJO, K.; ALBURQUERQUE, J.; MELO, F.; SEVILHA, M. A.; BRASILEIRO, D.; BARRETO, M. I.; LEAL-NETO, O. B.; BARBOSA, V.; CORREIA, W.; GUIMARÃES, R. J. P. S. Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical.** v. 43, p. 436-445, 2014. doi: 10.5216/rpt.v43i4.33607.

BATISTA, J.J.; DE ARAÚJO, H.D.A.; AGUIAR, T.W.A.; FERREIRA, S.A.O.; LIMA, M.V.; PEREIRA, D.R.; FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L.; MELO, A.M.M.A.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A.L.; COELHO, L.C.B.B. Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 - intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. **Acta Trop.** 2022 Apr;228:106312. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106312.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica : diretrizes técnicas: **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.– 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde de A a Z — Esquistossomose [Internet]**. 2021 Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esquistossomose-1/esquistossomose>. Acesso: 03 fev. 2023.

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

CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; DA-SILVA, T. G.; MARTINS, R. M.; BARBOSA, T. P.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 80, p. 329-334, 2008.doi: 10.1590/S0001- 37652008000200011.

CARDOSO, L. S.; COSTA, D. M.; ALMEIDA, M. C. F.; SOUZA, R. P.; CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I.; OLIVEIRA, R. R. Risk factors for asthma in a helminth endemic area in bahia, Brazil. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 796820, jan. 2012. doi: 10.1155/2012/796820.

CARVALHO, O. S.; AMARAL, R. S.; DUTRA, L.V.; SCHOLTE, R. G.; GUERRA, M. A. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil. In CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; Lenzi, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro. 2008;1124 pp.

CASTILLO, M.G.; HUMPHRIES, J.E.; MOURÃO, M.M.; MARQUEZ, J.; GONZALEZ, A. MONTELONGO, C.E. *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. **Dev Comp Immunol**. 2020 Mar;104:103557. doi: 10.1016/j.dci.2019.103557.

CHEN, S.; CHEN, Y.; CHEN, B.; CAI, Y. J.; ZOU, Z. L.; WANG, J. G.; LIN, Z.; WANG, X. D.; FU, L. Y.; HU, Y. R.; CHEN, Y. P.; CHEN, D. Z. Plumbagin Ameliorates CCl 4 - Induced Hepatic Fibrosis in Rats via the Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015;2015:645727. doi: 10.1155/2015/645727.

COELHO, P. M. Z.; CALDEIRA, R. L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human schistosomiasis. **Lancet**. 2014 Jun 28;383(9936):2253-64. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.

COLLINS, F. S.; GRAY, G. M.; BUCHER, J.R. Toxicology. Transforming environmental health protection. **Science**. 2008 Feb 15;319(5865):906-7. doi: 10.1126/science.1154619.

CORRÊA, G.; VILELA, R.; MENNA-BARRETO, R. F.; MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. **Parasitol Int**. 2009 Dec;58(4):424-37. doi: 10.1016/j.parint.2009.08.006.

CRIBB, D. M.; CLARKE, N. E.; DOI, S. A. R.; VAZ, NERY S. Differential impact of mass and targeted praziquantel delivery on schistosomiasis control in school-aged children: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. 2019 Oct 11;13(10):e0007808. doi: 10.1371/journal.pntd.0007808.

DANTAS-PEREIRA, L.; MENNA-BARRETO, R.; LANNES-VIEIRA, J. Extracellular Vesicles: Potential Role in Remote Signaling and Inflammation in *Trypanosoma cruzi*-Triggered Disease. **Front Cell Dev Biol**. 2021 Dec 20;9:798054. doi: 10.3389/fcell.2021.798054..

de ALBUQUERQUE MELO, A. M. M.; PEREIRA, D. R.; SALES, G. C. N.; SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; DE VASCONCELOS LIMA, M.; DE SIQUEIRA, W. N. Utilização do ensaio cometa para detectar efeito genotóxico do metanosulfonato de metila em células de *Biomphalaria glabrata*. **Atena Editora**: 1-388, 2019. DOI 10.22533/at.ed.8931914037.

de S LUNA, J.; dos SANTOS, A.F.; de LIMA, M.R.; de OMENA, M.C.; de MENDONÇA, F.A.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol**. 2005 Feb 28;97(2):199-206. doi: 10.1016/j.jep.2004.10.004.

DEJON-AGOBÉ, J.C.; EDOA, J.R.; ADEGNIKA, A.A.; GROBUSCH, M.P.; Schistosomiasis in Gabon from 2000 to 2021 - A review. **Acta Trop**. 2022 Apr;228:106317. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106317.

EL-BESHBISHI, S.N.; EL BARDICY, S.; TADROS, M.; AYOUB, M.; TAMAN, A. Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina*. **Acta Trop**. 2015 Jan;141(Pt A):37-45. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.09.018.

EL-BESHBISHI, S.N.; EL BARDICY, S.; TADROS, M.; AYOUB, M.; TAMAN, A. Biological activity of artemisinin-naphthoquine phosphate on *Schistosoma haematobium* stages and the vector *Bulinus truncatus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2019 Jun 1;113(6):320-325. doi: 10.1093/trstmh/try144.

FERREIRA, R. A.; DE OLIVEIRA, A. B.; GUALBERTO, S. A.; MIGUEL DEL CORRAL, J. M.; FUJIWARA, R. T.; GAZZINELLI GUIMARÃES, P. H.; DE ALMEIDA VITOR, R. W. New naphthoquinones and an alkaloid with in vitro activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. **Exp Parasitol**. 2012 Dec;132(4):450-7. doi: 10.1016/j.exppara.2012.09.003.

FERREIRA, S. B.; SALOMÃO, K.; DE CARVALHO DA SILVA, F.; PINTO, A. V.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F.; DE CASTRO, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. **Eur J Med Chem.** 2011 Jul;46(7):3071-7. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.03.012.

FIGUEIREDO, J. P.; OLIVEIRA, R. R.; CARDOSO, L. S.; BARNES, K. C.; GRANT, A. V.; CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I. Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area. **Parasite Immunol.** 2012 Dec;34(12):604-10. doi: 10.1111/pim.12001.

FREIRES, I.A.; SARDI, J.C.; de CASTRO, R.D.; ROSALEN, P.L. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharm Res.** 2017 Apr;34(4):681-686. doi: 10.1007/s11095-016-2069-z.

FUTURO, D.O.; FERREIRA, P.G.; NICOLETTI, C.D.; BORBA-SANTOS, L.P.; SILVA, F.C.D.; ROZENTAL, S.; FERREIRA, V.F. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. **An Acad Bras Cienc.** 2018;90(1 Suppl 2):1187-1214. doi: 10.1590/0001-3765201820170815.

GAMBARDELLA, C.; COSTA, E.; PIAZZA, V.; FABBROCINI, A.; MAGI, E.; FAIMALI, M.; GARAVENTA, F. 2015. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. **Marine Environmental Research** 111: 41-49.

GANDASEGUI, J.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; MURO, A.; BARBOSA, C. S.; MELO, F. L.; LOYO, R.; GOMES, E. C. S.; A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, p. e0006314-16, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006314.

Grazeffe, V. S.; Tallarico, L. F.; Pinheiro, A. S.; Kawano, T.; Suzuki, M. F.; Okazaki, K.; Pereira, C. A.; Nakano, E.. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research.** v. 654, p. 58-63, 2008.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L.; Human schistosomiasis. *Lancet.* 2006 Sep 23;368(9541):1106-18. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69440-3. PMID: 16997665.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am.** 2012 Jun;26(2):383-97. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.004.

GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C.; LANZA, J. S.; MELO, M. N.; MONTE-NETO, R. L.; MELO, I. M.; DIOGO, E. B.; FERREIRA, F.; CAMARA, C. A.; VALENÇA, W. O.; OLIVEIRA, R. N.; FRÉZARD, F.; SILVA, E. N. 2013. Potent naphthoquinones against antimony sensitive and resistant *Leishmania* parasites: synthesis of novel α - and nor- α -lapachone based 1,2,3- triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Eur J Med Chem.** Mai. 2013, 63:523-30. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.02.038.

HABIB, M.R.L.V.S.; ROLLINSON, D. ZHOU, X.N. Invasion and Dispersal of *Biomphalaria* Species: Increased Vigilance Needed to Prevent the Introduction and

Spread of Schistosomiasis. **Front Med** (Lausanne). 2021 Feb 10;8:614797. doi: 10.3389/fmed.2021.614797.

HAKURA, A.; MOCHIDA, H.; TSUTSUI, Y.; YAMATSU, K.; Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. **Chem Res Toxicol**. 1994 JulAug;7(4):559-67. doi: 10.1021/tx00040a012.

HUANG, A.G.; SU, L.J.; HE, W.H.; ZHANG, F.L.; WEI, C.S.; WANG, Y.H. Natural component plumbagin as a potential antibacterial agent against *Streptococcus agalactiae* infection. **J Fish Dis**. 2022 Jun;45(6):815-823. doi: 10.1111/jfd.13606.

IBRAHIM, A.M.; AHMED, A.K.; BAKRY, F.A.; ABDEL-GHAFFAR, F. Hematological, physiological and genotoxicological effects of Match 5% EC insecticide on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Jan;147:1017-1022. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.059.

JOHANN, L.; BELORGEY, D.; HUANG, H.H.; DAY, L.; CHESSE, M.; BECKER, K.; WILLIAMS, D.L.; DAVIOUD-CHARVET, E. Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as SmTGR inhibitors and new anti-schistosomal drugs. **FEBS J**. 2015 Aug;282(16):3199-217. doi: 10.1111/febs.13359.

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

Katz, Naftale. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte. **Editora Fiocruz**. CPqRR, 2018. CDD – 22. Ed 614.5.

KAWANO, Toshie; NAKANO, Eliana; WATANABE, L. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. **Fiocruz (Ed.)**, *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar. Carvalho, OS., Coelho, PMZ., e Lenzi HL, Rio de Janeiro , p. 347-391, 2008.

KING, C. H.; & SUTHERLAND, L. J.; BERTSCH, D. 2015. Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical-based mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 28: e0004290.

LAGO, E.M.; XAVIER, R.P.; TEIXEIRA, T.R.; SILVA, L.M.; da SILVA FILHO, A.A.; de MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Med Chem**. 2018 Jan;10(1):89-120. doi: 10.4155/fmc-2017-0112.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; NÚÑEZ-OLEA, J.; RÍOS, F.2016. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 125: 1-8.

LEE, J.J.; ZHANG, W.Y.; YI, H.; KIM, Y.; KIM, I.S.; SHEN, G.N.; SONG, G.Y.; MYUNG, C.S. Anti-proliferative actions of 2-decylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in

vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2011 Jul 22;411(1):213-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.145.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res.** 2003 Sep;544(1):43-64. doi: 10.1016/s1383-5742(03)00017-6. PMID: 12888107.

LEWIS, F.A.; TUCKER, M.S. Schistosomiasis. **Adv Exp Med Biol.** 2014;766:47-75. doi: 10.1007/978-1-4939-0915-5_3.

LI, G.; PENG, Y.; ZHAO, T.; LIN, J.; DUAN, X.; WEI, Y.; MA, J. Plumbagin Alleviates Capillarization of Hepatic Sinusoids In Vitro by Downregulating ET-1, VEGF, LN, and Type IV Collagen. **Biomed Res Int.** 2017;2017:5603216. doi: 10.1155/2017/5603216.

LI, X. Y.; DONG, X. Y.; BAI, X.; LIU, L.; WANG, J. J. 2014. The embryonic and postembryonic developmental developmental toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Physa acuta*. **Environmental Toxicology** 29, 697-704

Li, X.Y., Zhou, J., Yu, M., Wang, J.J., Pei, Y.C., 2009. Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72: 552-556.

LIMA, M. V.; SIQUEIRA, W. N.; SILVA, H. A. M. F.; LIMA FILHO, J. M.; FRANÇA, E. J.; MELO, A. M. M. A. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 26, p. 3350-3356, 2019.

LIMA, N. M. F., SANTOS, A. F., PORFÍRIO, Z., GOULART, M. O., SANT'ANA, A. E. G. 2002. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**, Jul. 2002, 83: 43-47. doi: 10.1016/s0001-706x(02)00055-4.

LIU, Y.; CAI, Y.; HE, C.; CHEN, M.; LI, H. Anticancer Properties and Pharmaceutical Applications of Plumbagin: A Review. **Am J Chin Med.** 2017;45(3):423-441. doi: 10.1142/S0192415X17500264.

LO, N. C.; BEZERRA, F. S. M.; COLLEY, D. G.; FLEMING, F. M.; HOMEIDA, M.; KABATEREINE, N.; KABOLE, F. M.; KING, C. H.; MAFE, M. A.; MIDZI, N.; MUTAPI, F.; MWANGA, J. R.; RAMZY, R. M. R.; SATRIJA, F.; STOTHARD, J. R.; TRAORÉ, M. S.; WEBSTER, J. P.; UTZINGER, J.; ZHOU, X. N.; DANSO-APPIAH, A.; EUSEBI, P.; LOKER, E. S.; OBONYO, C. O.; QUANSAH, R.; LIANG, S.; VAILLANT, M.; MURAD, M. H.; HAGAN, P.; GARBA, A.; Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. **Lancet Infect Dis.** 2022 Nov;22(11):e327-e335. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00221-3.

LORSUWANNARAT, N.; PIEDRAFITA, D.; CHANTREE, P.; SANSRI, V.; SONGKOOKRONG, S.; BANTUCHAI, S.; SANGPAIROT, K.; KUEAKHAI, P.; CHANGKLUNGMOA, N.; CHAICHANASAK, P.; CHANSELA, P.; SOBHON, P. The in vitro anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile

parasites of *Fasciola gigantica*. **Experimental Parasitology**. v. 136, p. 5-13, 2014. 29. doi: 10.1016/j.exppara.2013.10.004.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTA, P.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol**. 2013 Jan;133(1):18-27. doi: 10.1016/j.exppara.2012.10.003.

LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. **Adv Exp Med Biol**. 2019;1154:45-70. doi: 10.1007/978-3-030-18616-6_3.

LOYO, R. M.; BARBOSA, C. S. Bioindicadores para avaliação do risco potencial de transmissão da esquistossomose no açude Apipucos, Pernambuco. **Revista Ambiente & Água**. v. 11, p. 156-161, Mar 2016. doi: 10.4136/ambi-agua.1756.

MARTINS, M. C. B.; SILVA, M. C.; SILVA, H. A. F.; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; AIRES, A. L.; FALCÃO, E. P. S.; PEREIRA, E. C.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H. Barbatic acid offers a new possibility for control of *Biomphalaria glabrata* and schistosomiasis. **Molecules**. v. 22, p. 1-11, 2017. doi: 10.3390/molecules22040568.

McMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B.J.; ZHOU, X.N. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**. 2018 Aug 9;4(1):13. doi: 10.1038/s41572-018-0013-8.

McMANUS, D. P.; BERGQUIST, R.; CAI, P.; RANASINGHE, S.; TEBEJE, B. M.; YOU, H. Schistosomiasis-from immunopathology to vaccines. **Semin Immunopathol**. 2020 Jun;42(3):355-371. doi: 10.1007/s00281-020-00789-x.

MEHDIZADEH, S.; TAHERIAN, M.; BAYATI, P.; MOUSAVIZADEH, K.; PASHANGZADEH, S.; ANISIAN, A.; MOJTABAVI, N. Plumbagin attenuates Bleomycin-induced lung fibrosis in mice. **Allergy Asthma Clin Immunol**. 2022 Oct 21;18(1):93. doi: 10.1186/s13223-022-00734-7.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Boletim epidemiológico: Casos graves e óbitos por dengue no Brasil, 2019 a 2022; Vigilância epidemiológica do sarampo no Brasil – SE 1 a 17 de 2022; Mortalidade materna no Brasil, 2009 a 2020; **Mortalidade por esquistossomose mansoni no Brasil, de 2015 a 2019**. Vol. 53, Nº 20, 05 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no20/view>>. Acesso: 04 fev. 2023.

MOLOO, A. **Schistosomiasis elimination**: refocusing on snail control to sustain progress. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress>>. Acesso em: 09 jan. 2023.

MONE, N.S.; SYED, S.; RAVICHANDIRAN, P.; SATPUTE, S.K.; KIM, A.R.; YOO, D.J. How Structure-Function Relationships of 1,4-Naphthoquinones Combat Antimicrobial Resistance in Multidrug-Resistant (MDR) Pathogens. **ChemMedChem**. 2023 Jan 17;18(2):e202200471. doi: 10.1002/cmdc.202200471.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

NTUNGWE, N. E.; DOMÍNGUEZ-MARTÍN, E.M.; ROBERTO, A.; TAVARES, J.; ISCA, V.M.S.; PEREIRA, P.; CEBOLA, M.J.; RIJO, P. *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Curr Pharm Des**. 2020;26(24):2892-2908. doi: 10.2174/1381612826666200406083035.

OLIVEIRA, E. C. A.; PIMENTEL, T. J. F.; ARAUJO, J. P. M.; OLIVEIRA, L. C. S.; FERNANDO, V. C. N.; LOYO, R. M.; GOMES, E. C. S.; MOREIRA, R. S.; BARBOSA, C. S. Investigação sobre os casos e óbitos por esquistossomose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, 2005- 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. 1-11, 2018. doi: 10.5123/S1679- 49742018000400010.

OLIVEIRA, M. S. C.; MORAIS, S. M.; MAGALHÃES, D. V.; BATISTA, W. P.; VIEIRA, Í. G. P.; CRAVEIRO, A. A.; MENEZES, J. E. S. A.; CARVALHO, A. F. U.; LIMA, G. P. G. 2011. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica** 117: 165-170.

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

ORTIZ-PÉREZ, E.; RIVERA, G.; SALAS, C.O.; ZARATE-RAMOS, J.J.; TROFYMCHUK, O.S.; HERNANDEZ-SOBERANIS, L.; PERALES-FLORES, J.D.; VÁZQUEZ, K. Natural and Synthetic Naphthoquinones as Potential Anti-Infective Agents. **Curr Top Med Chem**. 2021;21(22):2046-2069. doi: 10.2174/1568026621666210915121348.

OSMAN, A.M.; ROTTEVEEL, S.; DEN BESTEN, P.J.;VAN NOORT, P.C. In vivo exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: menadione is more toxic to mussels than lawsone. **J Appl Toxicol** 24:135–141 (2004)

PADADHYE, S.; DANDAWATE, P.; YUSUFI, M.; AHMAD, A.; SARKAR, F. H. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. **Med Res Rev**. 2012 Nov;32(6):1131- 58. doi: 10.1002/med.20235.

PAIVA, S. R.; MARQUES, S. S.; FIGUEIREDO, A. R.; KAPLAN, A. C. Plumbaginales: a pharmacological approach. **Floresta e Ambiente**. V. 10, n. 1, p. 98-105, 2003.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; AHMAD, M.I. Plumbagin and Its Role in Chronic Diseases. **Adv Exp Med Biol**. 2016;929:229-246.doi:10.1007/978-3-319-41342-6_10.

PAVLICA, Mirjana *et al*. Detecção de micronúcleos em hemócitos de mexilhão zebra e caracol ramshorn expostos ao pentaclorofenol. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, n. 1-2, pág. 145-150, 2000.

PEREIRA, A.S.; CAVALCANTI, N.L.; NASCIMENTO, G.A.; NASCIMENTO-SILVA, J.L.; PADILHA, R.J.; VIEGAS, L.F.; ALVES, L.C.; LIMA-FILHO, J.L.; CHAVES, M.E. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma*

mansoni (SLM strain) isolated from infected mice. **Parasitol Res.** 2013 Mar;112(3):1087-96. doi: 10.1007/s00436-012-3235-9.

PÉREZ-SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GUTIÉRREZ YAP, D.; GIMÉNEZ TURBA, A. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. **Chem Biodivers.** 2005 Feb;2(2):264-74. doi: 10.1002/cbdv.200590009.

PERIASAMY, H.; ISWARYA, S.; PAVITHRA, N.; SENTHILNATHAN, S.; GNANAMANI, A. In vitro antibacterial activity of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lett Appl Microbiol.** 2019 Jul;69(1):41-49. doi: 10.1111/lam.13160.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa para enfrentamento das Doenças Negligenciadas no estado de Pernambuco SANAR / 2019-2022/** Secretaria Estadual da Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. – 1º edição Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2019. 48p.: Séria A. Normas e Manuais Técnico. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/plano_sanar_2-19-2022.pdf> Acesso: 05 fev. 2023.

PINTO, A.V.; de CASTRO, S.L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules.** 2009 Nov 10;14(11):4570-90. doi: 10.3390/molecules14114570.

PINTO, A. V.; PINTO, M. D.; GILBERT, B.; PELLEGRINO, J.; MELLO, R. T.. *Schistosomiasis mansoni*: Blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 71, p. 133-135, 1977.doi: 10.1016/0035-9203(77)90078-5.

PRATA, A. (2008). Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 41(**Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2008 41(6)). Doi:10.1590/S0037-86822008000600027.

RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.R.; AKASH, S.; SHOHAG, S.; AHMED, L.; SUPTI, F.A.; RAUF, A.; ALJOHANI, A.S.M.; AL ABDULMNEM, W.; KHALIL, A.A.; SHARMA, R.; THIRUVENGADAM, M. Naphthoquinones and derivatives as potential anticancer agents: An updated review. **Chem Biol Interact.** 2022 Dec 1;368:110198. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110198.

RAMOS-MILARÉ, Á.C.F.H.; OYAMA, J.; MURASE, L.S.; SOUZA, J.V.P.; GUEDES, B.S.; LERA-NONOSE, D.S.S.L.; MONICH, M.T.; BRUSTOLIN, A.Á.; DEMARCHI, I.G.; TEIXEIRA, J.J.V.; LONARDONI, M.V.C. The anti-Leishmania potential of bioactive compounds derived from naphthoquinones and their possible applications. A systematic review of animal studies. **Parasitol Res.** 2022 May;121(5):1247-1280. doi: 10.1007/s00436-022-07455-1.

RANI, R.; NARSIMAN, B.; VARMA, R.S.; KUMAR, R. Gum-based nanocapsules comprising naphthoquinones enhance the apoptotic and trypanocidal activity against

Trypanosoma evansi. **Eur J Pharm Sci.** 2022 Apr 1;171:106118. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106118.

Rey, Luís **Parasitologia**: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais/ Luís Rey. - 4.ed. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. il. ; ISBN 978-85-277-1406-8

RIBEIRO, K.A.; de CARVALHO, C.M.; MOLINA, M.T.; LIMA, E.P.; LÓPEZ-MONTERO, E.; REYS, J.R.; de OLIVEIRA, M.B.; PINTO, A.V.; SANTANA, A.E.; GOULART, M.O. 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.** 2009 Jul;111(1):44-50. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.02.008.

ROCHA, Thiago José Matos et al . Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 7, n. 2, p. 27-32, jun. 2016.

SANTOS, D. B.; MOREIRA-FILHO, J. T.; MELO, A. O.; LEMES, J. A.; SILVA, L. D.; ROCHA, T. L.; ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J.; BEZERRA, J. C. B. 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.

SAOWAKON, N.; LORSUWANNARAT, N.; CHANGKLUNGMOA, N.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. *Paramphistomum cervi*: the in vitro effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure. **Exp Parasitol.** 2013 Feb;133(2):179-86. doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.018.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE (SES-PE). Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de Esquistossomose Mansoní Anual** | Out. 2021. Disponível em: <https://www.cievspe.com/_files/ugd/3293a8_f36f0e0da8f348f587e76dda4ab5ce29.pdf>. Acesso: 05 fev. 2023.

SHANG, Y.; CHEN, C.; LI, Y.; ZHAO, J.; ZHU, T. Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1,4-naphthoquinone. **Environ Sci Technol.** 2012 Mar 6;46(5):2935-42. doi: 10.1021/es203032v.

SHARMA, N.; SHUKLA, A.K.; DAS, M.; DUBEY, V.K. Evaluation of plumbagin and its derivative as potential modulators of redox thiol metabolism of *Leishmania* parasite. **Parasitol Res.** 2012 Jan;110(1):341-8. doi: 10.1007/s00436-011-2498-x.

SILVA, E. de O.; WANDERLEY, S. Análise do Programa de Controle da Esquistossomose na redução dos indicadores epidemiológicos da doença no Brasil, de 1995 a 2017. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S. l.], v. 13, p. 9, 2022. doi: 10.5123/S2176-6223202200956.

SILVA, H. A. M. F.; SIQUEIRA, W. N.; SÁ, J. L. F.; SILVA, L. R. S.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A. L.; AMÂNCIO, F. F.; PEREIRA, E. C.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.;

MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**. v. 178, p. 97-102, 2018a. 43. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.019.

SILVA, H. A. M. F.; SIQUEIRA, W. N.; SÁ, J. L. F.; SILVA, L. R. S.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A. L.; AMÂNCIO, F. F.; PEREIRA, E. C.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H..Data set of the toxic effects of divaricatic acid deposite on *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Data in Brief**. v. 19, p. 1393-1397, 2018b. doi: 10.1016/j.dib.2018.05.071.

SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; SIQUEIRA, W. N.; LIMA, M. V.; MARTINS, M. C. B.; AIRES, A. L.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; FALCÃO, E. P. D. S.; BURIL, M. L. L.; PEREIRA, E. C.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H. D. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**. v. 196, p. 172-179, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.05.010.

SILVA, K. E. R.; SILVA, R. M. F.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; ROLIMNETO, P. J. Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 33, 1, 2012.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

SOARES, D. A.; SOUZA, S. A.; SILVA, D. J.; SILVA, A. B.; CAVALCANTE, U. M. B.; LIMA, C. M. B. L. Avaliação epidemiológica da esquistossomose no estado de Pernambuco pelo modelo de regressão beta. **ARCHIVES of Health Sciences**, 2019, ISN 2318-3691, p. 116- 120. doi: 10.17696/2318-3691.26.2.2019.1302.

SOKOLOW, S. H.; WOOD, C. L.; JONES, I. J.; SWARTZ, S. J.; LOPEZ, M.; HSIEH, M. H.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M.; RICKARDS, C.; de LEO, G. A. 2016. Global assessment of schistosomiasis control over the past century shows targeting the snail intermediate host works best. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 10: e0004794.

SOUSA, D. G. DOS S.; DE SOUSA, R. L. T., DE MESQUITA, D. R.; ÁLVARES, C. M. DE O. G.; BARBOSA, M. P.; SILVA, C. L. M.; LEAL, A. R. DA S.; CARDOSO, K. T. DE S. N.; FILHO, P. S. DA P. S.; & DA SILVA, E. L. (2021). Desafios e perspectivas do diagnóstico da esquistossomose mansônica no Brasil: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 13(3), e6430. doi:10.25248/reas.e6430.2021.

STRICKLAND, G. T.; Hunter's Tropical Medicine and emerging infectious diseases. 8.ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, **Rev. Inst. Med. trop.** Abr. 2001. 1192p. doi: 10.1590/S0036-46652001000200018.

SUMSAKUL, W.; PLENGSURIYAKARN, T.; CHAIJAROENKUL, W.; VIYANANT, V.; KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K. Antimalarial activity of plumbagin *in vitro* and in animal models. **BMC Complement Altern Med**. 2014 Jan 12;14:15. doi: 10.1186/1472-6882-14-15.

TEDLA, B. A.; PICKERING, D.; BECKER, L.; LOUKAS, A.; PEARSON, M. S. Vaccination with *Schistosoma mansoni* Cholinesterases Reduces the Parasite Burden and Egg Viability in a Mouse Model of Schistosomiasis. **Vaccines** 2020, 8, 162. doi:10.3390/vaccines8020162.

TEKWU, E.M.; ANYAN, W.K.; BOAMAH, D.; BAFFOUR-AWUAH, K.O.; KEYETAT TEKWI, S.; PENLAP BENG, V.; NYARKO, A.K.; BOSOMPEM, K.M. Mechanically produced schistosomula as a higher-throughput tools for phenotypic pre-screening in drug sensitivity assays: current research and future trends. **Biomark Res.** 2016 Nov 22;4:21. doi: 10.1186/s40364-016-0075-2.

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.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2008. p. 459–484.

THAKOR, N.; JANATHIA, B. Plumbagin: A Potential Candidate for Future Research and Development. **Curr Pharm Biotechnol.** 2022;23(15):1800-1812. doi: 10.2174/1389201023666211230113146.

TRIPATHI, S.K.; PANDA, M.; BISWAL, B.K. Emerging role of plumbagin: Cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy. **Food Chem Toxicol.** 2019 Mar;125:566-582. doi: 10.1016/j.fct.2019.01.018.

TSAO, Y. C.; CHANG, Y. J.; WANG, C. H.; CHEN, L. Discovery of Isoplumbagin as a Novel NQO1 Substrate and Anti-Cancer Quinone. **Int J Mol Sci.** 2020 Jun 19;21(12):4378. doi: 10.3390/ijms21124378.

WALKER, A. J. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasit Vectors.** 2011 Oct 20;4:203. doi: 10.1186/1756-3305-4-203.

WANG, H.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, D.; CHENG, X.; YANG, F.; ZHANG, Q.; XUE, Z.; LI, Y.; ZHANG, L.; YANG, L.; MIAO, G.; LI, D.; GUAN, Z.; DA, Y.; YAO, Z.; GAO, F.; QIAO, L.; KONG, L.; ZHANG, R. Plumbagin protects liver against fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis via inhibiting inflammation and collagen production. **Oncotarget.** 2016 Dec 13;7(50):82864-82875. doi: 10.18632/oncotarget.12655.

WANG, S. H.; HUANG, P. P.; LI, X. Y.; WANG, C. Y.; ZHANG, W. H.; WANG, J. J. 2010. Embryonic and developmental toxicity of the ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on goldfish. **Environmental Toxicology** 25: 243-250.

WEERAKOON, K.G.; GOBERT, G.N.; CAI, P.; McMANUS, D.P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev.** 2015 Oct;28(4):939-67. doi: 10.1128/CMR.00137-14.

WHO. Autor desconhecido (1965). Molluscicide screening and evaluation.. **Bulletin of the World Health Organization**, 33 (4), 567 - 581. World Health Organization. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/262863>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis. Fev. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso: 13 fev. 2023.

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 Res Int**. 2020 Dec 1;2020:6940953. doi: 10.1155/2020/6940953.

YOU, H.; McMANUS, D.P.; HU, W.; SMOUT, M.J.; BRINDLEY, P.J.; GOBERT, G.N. Transcriptional responses of in vivo praziquantel exposure in schistosomes identifies a functional role for calcium signalling pathway member CamKII. **PLoS Pathog**. 2013 Mar;9(3):e1003254. doi: 10.1371/journal.ppat.1003254.

ZHANG, S.; COULTAS, K.. Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. **International Journal for Parasitology**. v.3, p.28-34, 2013.

APÊNDICES – ARTIGO

França WWM, da Silva AM, Diniz EGM, Silva HAMF, Pereira DR, De Melo AMMA, Coelho LCBB, de Azevedo Albuquerque MCP, de Araújo HDA, de Lima Aires A. 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 mansonii. **Pest Manag Sci.** 2022 Dec;78(12):5172-5183. doi: 10.1002/ps.7136. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36053991.

Research Article



Received: 22 December 2021

Revised: 7 June 2022

Accepted article published: 20 August 2022

Published online in Wiley Online Library: 20 September 2022

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.7136

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,^{a,b} Adriana Maria da Silva,^b Emily Gabriele Marques Diniz,^b Hianna Arely Milca Fagundes Silva,^c Dewson Rocha Pereira,^c Ana Maria Mendonça Albuquerque De Melo,^c Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,^d Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque,^{b,e} Hallysson Douglas Andrade de Araújo^{c,d} and André de Lima Aires^{a,b,e*}

Abstract

BACKGROUND: Snails of the genus *Biomphalaria* 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 (LC₅₀ of 0.56, 0.93, 0.68, 0.51 and 0.74 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage, respectively) and adult snails (LC₅₀ of 3.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$). 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 humans (definitive host), while being moderately toxic to *A. salina*, a crustacean widely used in ecotoxicity tests.

© 2022 Society of Chemical Industry.

Keywords: comet assay; embryotoxicity; hemocytes; molluscicidal; naphthoquinone; schistosomiasis

* Correspondence to: Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, Prince Edward Island, Brazil. E-mail: andre.laires@ufpe.br

^a Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (IUKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

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

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

^e Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

1 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* 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* 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 cercariae, 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* s. 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.^{11–13} 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.^{14–16}

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.^{19–21} The naphthoquinone plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (Fig. 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.^{24–26}

Artemia salina is widely used in the toxicity assessment of natural or synthetic molecules with biotechnological potential, as in

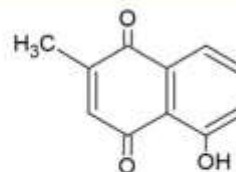


Figure 1. Chemical structure of plumbagin.

molluscicide screening. This biological model is used for being a safe, practical, cost-effective and highly sensitive method.^{27–31} 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*.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Drugs

Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone (C₁₁H₈O₃, molecular weight 188.18)) from *Plumbago indica* was obtained from Sigma Chemical Co. (<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).

2.2 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 (ILKA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE). The molluscs were kept in plastic tanks (50 × 23 × 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.).

2.3 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 × 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⁻¹). 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 × 15 mm) and each group was exposed for 24 h to the concentrations (0.3–2 µg mL⁻¹) 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 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 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 $25 \pm 3^\circ\text{C}$), 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.^{29–31}

2.4 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 $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) was evaluated on groups containing 10 subjects in the same container for 24 h. All concentrations were evaluated in triplicate, so that at the end 30 snails were exposed to each concentration. *B. glabrata* ($n = 10/\text{group}$) were exposed for 24 h to different concentrations ($2\text{--}4 \mu\text{g mL}^{-1}$) of plumbagin, previously diluted in 0.5% DMSO and dechlorinated filtered water (pH 7.0, at $25 \pm 3^\circ\text{C}$) 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}

2.5 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 $100 \mu\text{L}$ sample of hemolymph was collected and transferred to conventional light microscopy slides. Then, $100 \mu\text{L}$ 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 $200 \mu\text{L}$ 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 ($n = 1000/\text{slide}$) were analyzed under a binocular optical microscope with a $100\times$ objective, to assess the frequency of hemocyte alterations, classified as micronucleus, binucleation, or apoptosis.

A $10\text{-}\mu\text{L}$ 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 hemolymph³⁰:

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

2.6 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 ($2\text{--}3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) of plumbagin for 48 h. Twenty-four hours after the end of exposure, the hemolymph of seven individuals in each group was collected with the aid of a micropipette with siliconized tips and placed in previously siliconized Eppendorfs. About $100 \mu\text{L}$ of this hemolymph was dissolved in $100 \mu\text{L}$ 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 two 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^{-1} 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 $30 \mu\text{L}$ 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 five 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).

2.7 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($28^\circ\text{C} \pm 3$). 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 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

2.8 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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).^{29–31}

2.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ 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).

3 RESULTS

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

Plumbagin was active against *B. glabrata* embryos at all life stages (Fig. 2(A)–(E)), with a dose-dependent effect. This effect was significant ($P < 0.0001$) for blastula at a concentration of 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$

and 100% lethality was reached at 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for gastrula (Fig. 2(A), (B)). For blastula, trochophore, and veliger stages, 100% lethality was achieved at a concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 2(A), (C), (D)) and for hippo stage at a concentration of 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 2(E)). Lethal concentrations for 50% (LC_{50}) of embryos ranged from the minimum 0.513 (Veliger) to maximum 0.929 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (gastrula) and for 90% (LC_{90}) ranged from minimum 0.702 (veliger) to maximum 1.348 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (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 (Fig. 3(A)–(E)) and 100% viability (Fig. 2). Exposure to niclosamide (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was 100% lethal for all embryonic stages (Figs 2 and 3(F)–(J)). The morphological alterations of the embryotoxic activity of plumbagin on *B. glabrata* are shown in Fig. 3. Among the toxic and teratogenic effects, we observe dead embryos (Fig. 3(H)), hydropic embryos (Fig. 3(M)) as the most frequent alteration among malformed ones, and embryos with developmental delay (Fig. 3(O)) (Fig. 3(K)–(O)).

3.2 Plumbagin has a molluscicide effect but does not alter the fecundity and fertility of adults of *B. glabrata*

Figure 4(A) 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ caused lethargy, shell retraction, increased mucus production and after 6 h the snails released hemolymph. Additionally, concentrations 3.0, 3.5 and 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ caused a lethality of 20%, 40% and 80%, respectively after 24 h and reached a lethality of 37%, 60% and 100% after 48 h (Fig. 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 (Fig. 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.

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

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

Figure 6 expresses the total number of hemocytes (Fig. 6(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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0.001$). Regarding the frequency of hemocytic alterations, there was no difference between groups C and C + DMSO, where the mean frequency of apoptosis (Fig. 6

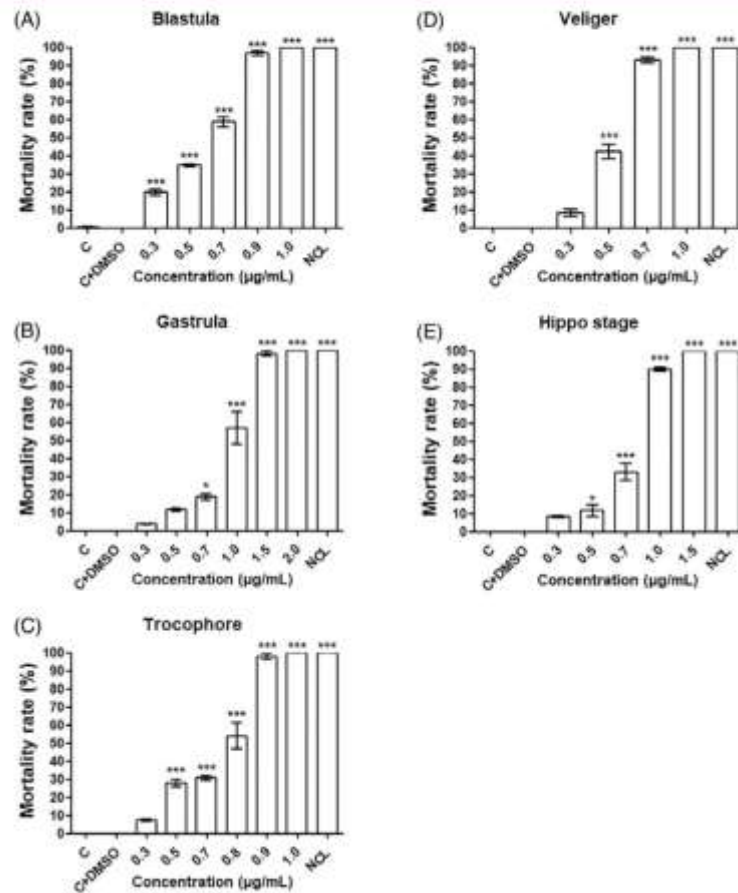


Figure 2. Toxicity of plumbagin on embryonic stages of *B. glabrata*. (A) blastula, (B) gastrula, (C) trochophore, (D) veliger and (E) hippo stage. (C) Filtered and dechlorinated water. C + DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide 1 µg mL⁻¹. Significant differences **P* 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

(B) was 18.67 ± 5.51 and 19.67 ± 11.59 out of 1000 cells, respectively. Binucleation (Fig. 6(C)) and micronuclei (Fig. 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⁻¹ the mean frequency of apoptosis was

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

Experimental groups	LC ₁₀ (µg mL ⁻¹)	LC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	LC ₉₀ (µg mL ⁻¹)
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)
<i>Artemia salina</i>	1.931 (1.89–1.972)	2.264 (2.223–2.305)	2.597 (2.556–2.638)

Results expressed as mean (Standard error).



Figure 3. *B. glabrata* embryos exposed to 0.5% dimethylsulfoxide in filtered and dechlorinated water (A–E, x400), niclosamide ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (F–J, x400), plumbagin (K–O, x400). In (A), (F) and (K) ($0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) blastula stage. In (B), (G) and (L) ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) gastrula stage. In (C), (H), and (M) ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) trochophore stage. In (D), (I) and (N) ($0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) veliger stage. In (E), (J) and (O) ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) hippo stage stage. Morphological changes in embryos: 1—healthy; 2—dead; 3—hydropic; 4—developmental delay.

113 ± 10.54 , 202.7 ± 26.08 , 207 ± 40.04 and $182.7 \pm 24.21/1000$ cells respectively (Fig. 6(B)). Despite the low frequency, binucleation was seen in groups exposed to plumbagin with a frequency ranging from 2 ± 2 to 9.67 ± 2.08 (Fig. 6(C)). Micronucleus was the rarest alteration found at concentrations of 2.5 – $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a mean frequency of 0.67 ± 1.15 , 1 ± 1 , and 1 ± 1 , none of them statistically significant compared to controls. The $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration was not evaluated as it was considered a lethal concentration.

3.4 Plumbagin causes DNA damage in *B. glabrata* hemocytes

In Fig. 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 (Fig. 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 Fig. 8(B).

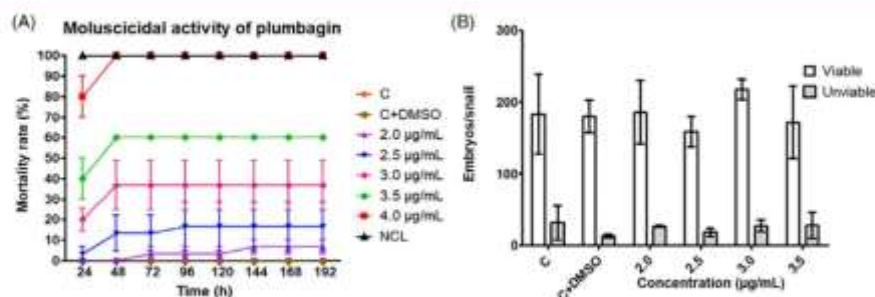


Figure 4. Mortality rate (A) and fecundity and fertility (B) of adults of *B. glabrata* exposed to plumbagin for 24 h and evaluated for 8 consecutive days after exposure. (C) Filtered and dechlorinated water. C + DMSO: 0.5% DMSO in filtered and dechlorinated water. NCL: Niclosamide 1 µg mL⁻¹. Plumbagin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

3.5 Plumbagin was toxic against *S. mansoni* cercariae

Changes in motility, such as intense vibratory movement without locomotion, were observed within the shortest time interval (15 min) at concentrations of 2 and 2.5 µg mL⁻¹, although all cercariae were still alive. On the other hand, even in this interval, 3.0 µg mL⁻¹ of plumbagin caused 35% mortality of cercariae with separation of the cercarial body and the tail (Fig. 9(C)), while the others were found adhered to the plate and with reduced movement. At a concentration of 1.0 µg mL⁻¹ of plumbagin, mortality occurred after 60 min, reaching 100% mortality after 120 min (Table 2). 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.

3.6 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 Fig. 10. Plumbagin at concentrations between 0.5–2.0 µg mL⁻¹ did not

cause significant mortality to *A. salina*. On the other hand, at concentrations of 2.25 and 2.5 µg mL⁻¹, 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⁻¹).

4 DISCUSSION

Naphthoquinone compounds have already been evaluated for their embryotoxic and molluscicidal action against *Schistosoma* vector snails.^{21,27–30} 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*.

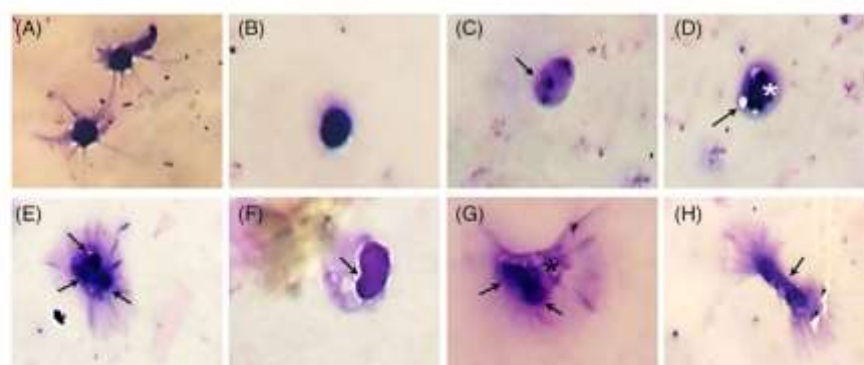


Figure 5. *B. glabrata* hemocytes. (A) Granulocyte hemocytes and (B) Hyalinocyte hemocyte—Control group exposed to 0.5% DMSO. (C) Hyalinocyte hemocyte with decondensed nucleus (arrow) and non-visible cytoplasm. (D) Hyalinocyte hemocyte with vacuoles and fragmented nucleus (arrow indicates vacuoles in 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.

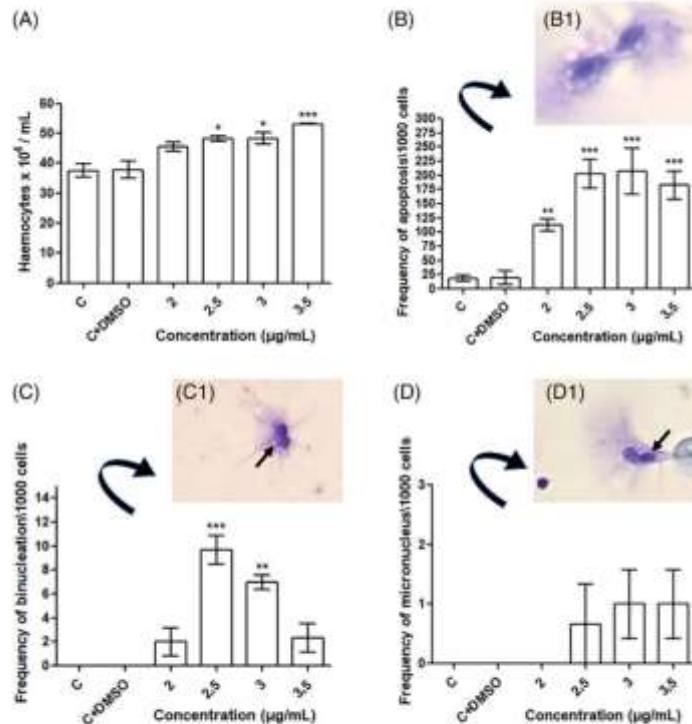


Figure 6. Morphological and quantitative alterations of *B. glabrata* hemocytes exposed to plumbagin. (A) Count of hemocytes/mL of hemolymph. (B) Number of apoptosis per 1000 analyzed cells. (C) Number of binucleation (arrow) per 1000 analyzed cells. (D) Number of micronuclei (arrow) per 1000 analyzed 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.

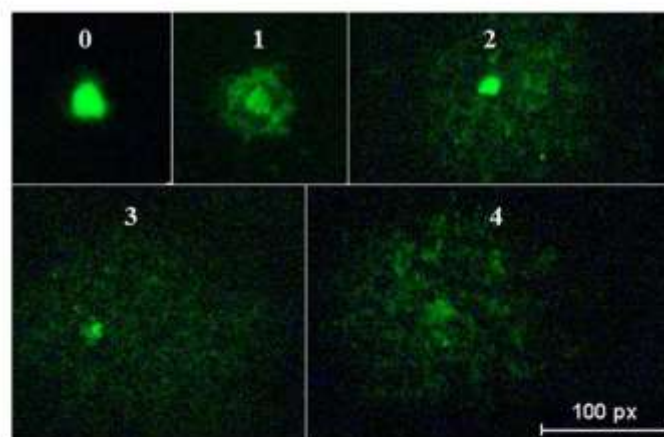


Figure 7. Comet assay images obtained from *Biomphalaria glabrata* hemocytes, and DNA damage after exposure to different concentrations of plumbagin. In the images, the five degrees of damage (0–4) analyzed and quantified, where 0 indicates absence, 1 (minimum damage) to 4 (maximum damage) indicates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

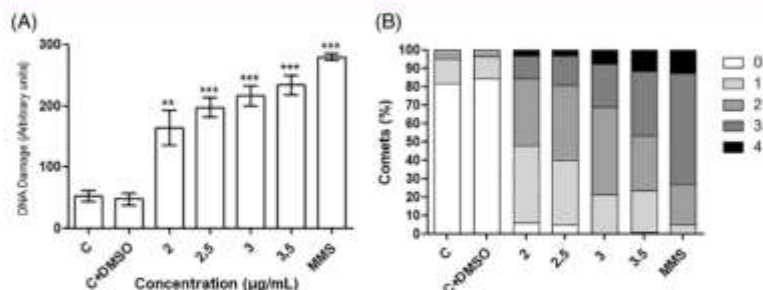


Figure 8. DNA damage of *B. glabrata* hemocytes determined by the comet assay. Were analyzed 500 cell nuclei per group. In (A) Damage Index (DI) and (B) percentage distribution of each damage level by concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$. (C) Filtered and dechlorinated water, C + DMSO: 0.5% DMSO in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

It is recognized that early embryonic stages are less susceptible to molluscicidal agents.^{28,30} In our study, the blastula and gastrula stages resulted in 50% inviability (dead and malformed) in LC_{50} of 0.556 and 0.929 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of plumbagin, while for the hippo stage the LC_{50} was 0.745 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 1). Santos et al. evaluated the toxicity of 14 naphthoquinone compounds against blastula, considered seven 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, results similar to the studies by Santos et al.^{21,38,39} 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.^{21,38–41} (Table 1).

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.^{29–31}

Here, the LC_{50} of plumbagin was 3.558 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against adults of the species *B. glabrata*, LC_{50} similar to lapachol (3.283 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and isolapachol (3.049 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 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

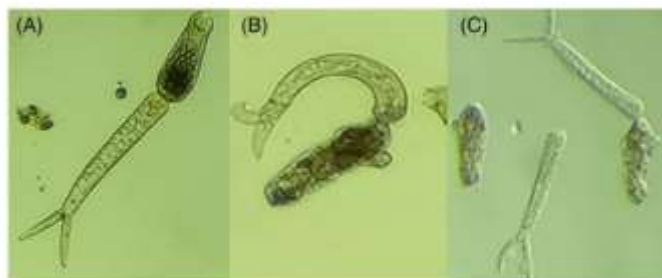


Figure 9. *Schistosoma mansoni* cercariae. In (A), cercariae exposed to a 0.5% DMSO solution in filtered water (C + DMSO). In (B), cercariae exposed to 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Niclosamide with a granular body and a contracted tail. In (C), cercariae exposed to 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of plumbagin for 15 min, highlighting the retraction of the cercarial body and tail, in addition to the separation between the tail and the cercarial body.

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

Experimental groups	Exposure time (min)			
	15	30	60	120
C	–	–	–	–
C + DMSO	–	–	–	–
Plumbagin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
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 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Absence of lethality (–), elimination of less than 50% of cercariae (+), elimination of more than 50% of cercariae (++) and complete elimination of cercariae (+++).

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 *Ramallia aspera* and latex of *Euphorbia millii* var. *Hislopilii*,^{50,45} 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 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ during 24 h of exposure.⁴⁶

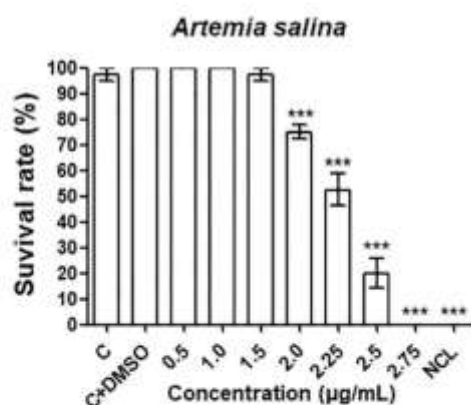


Figure 10. Toxicity of plumbagin in the bioindicator *Artemia salina* after 24 h of exposure. C: negative control (dechlorinated filtered water), C + DMSO: 0.5% DMSO in dechlorinated filtered water and NCL: niclosamide control ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). *** indicates greater P -value < 0.001 .

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 (Fig. 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 *Ramallia aspera*, essential oil from the leaf of *Croton rufodolophianus*, 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 (Fig. 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 (Fig. 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 molluscan 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

cercarial 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 artemisin-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 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 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 cercaricidal 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 180 min and 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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*.

5 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.

ACKNOWLEDGEMENTS

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.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- WHO. Schistosomiasis (2021) Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> [5 July 2021].
- McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ and Zhou XM. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 4:13 (2018).
- 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 and Santos-Preciado J. Neglected Tropical Diseases. Springer, Vienna, pp. 16–26 (2015).
- Katz N. Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthoses. Belo Horizonte: Instituto René Rachou. Available: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662> [5 July 2021].
- Barbosa CS, Loyo RM, WRC DN, Gomes EC De S, Da Silva BM, Dos Santos GM et al. Inquérito malacológico em localidades endêmicas para esquistossomose em Pernambuco. *Rev Eletrônica Farm* 11:1–9 (2019).
- Assaré RK, Tian-Bi YNT, Yao PK, N'Guessan NA, Ouattara M, Yapi A et al. 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:e0004329 (2016).
- Wiegand RE, Mwinzi PNM, Montgomery SP, Chan YL, Andiego K, Omedo M et al. A persistent hotspot of *Schistosoma mansoni* infection in a five-year randomized trial of praziquantel preventative chemotherapy strategies. *J Infect Dis* 217:1672 (2018).
- 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> [6 July 2021].
- McCullough F. The Role of Mollusciciding in Schistosomiasis Control, (1992). Available: http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_SCHISTO_92.107.pdf [6 July 2021].
- Sokolow SH, Wood CL, Jones U, Swartz SJ, Lopez M, Hsieh MH et al. Global assessment of Schistosomiasis control over the past century shows targeting the snail intermediate host works best. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004794 (2016).
- Oliveira-Filho EC and Paumgartner FJ. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol Environ Saf* 46:342–350 (2000).
- Coelho P and Caldeira RL. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect Dis Poverty* 5:57 (2016).
- Faria RX, Rocha LM, Souza EPBS, Almeida FB, Fernandes CP and Santos JAA. Molluscicidal activity of *Mankara subsericea* (Mart.) dubard on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Acta Trop* 178:163–168 (2018).
- 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> [10 July 2021].
- Alzabib AA, Abobakr Y, Al-Sarar AS, Hussein HI, Basuda OA and El-Gamal AA, Abdel-Kader MS and El-Komy MH. Molluscicidal activity of cardiac glycosides isolated from *Adenium obesum*. *Pest Manage Sci* 75:2770–2775 (2019).
- Matos JL, da Silva KR, de Lima Paula LA, Cunha WR, Ramos SB, Rodrigues V et al. Molluscicidal and cercaricidal activities of curcumin on *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Pest Manage Sci* 76:1228–1234 (2020).
- 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).
- Alferova VA, Shuvalov M, Korshun VA and Tyurin A. Naphthoquinone-derived polyol macrolides from natural sources. *Russ Chem Bull* 68:955–966 (2019).
- El-Beshbishi SN, El Bardicy S, Tadros M, Ayoub M and Taman A. Spotlight on the in vitro effect of artemisinin-naphthoquinone phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina*. *Acta Trop* 141:37–45 (2015).
- El-Beshbishi SN, El Bardicy S, Tadros M, Ayoub M and Taman A. Biological activity of artemisinin-naphthoquinone phosphate on *Schistosoma*

- haematobium stages and the vector *Bulinus truncatus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **113**:320–325 (2019).
- 21 Dos Santos DB, Filho JT, Melo A, Araújo Lemes J, Silva L, Lopes Rocha T et al. 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 et al. 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-Bírová 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**: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**:559–567 (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**:2935–2942 (2012).
 - 27 Martins MCB et al. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PLoS One* **9**:e111102 (2014).
 - 28 Procópio TF et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One* **10**:e0126612 (2015).
 - 29 Araújo HAD, Silva LRS, Siqueira WN, Fonseca C, Silva HS, Melo AMMA et al. 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 et al. 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 et al. Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 - intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. *Acta Trop* **228**:106312 (2022).
 - 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**:184–191 (1988).
 - 34 Grazeff VS, Tallarico Lde F, Pinheiro Ade S, Kawano T, Suzuki MF, Okazaki K et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat Res* **654**: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**:43–64 (2003).
 - 36 FINNEY DJ. The adjustment for a natural response rate in probit analysis. *Ann Appl Biol* **36**:187–195 (1949 Jun). <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1949.tb06408.x>.
 - 37 Santos AF, Ferraz PA and 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**:1199–1202 (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**:92–93 (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**:43–47 (2002).
 - 40 Camara CA, Silva TM, Da-Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, Pinto AC et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone and derivatives. *An Acad Bras Cienc* **80**:329–334 (2008).
 - 41 Ribeiro KA, de Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, López-Montero E, Reys JR et al. 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**:44–50 (2009).
 - 42 Araújo PS, Caixeta MB, Brito RDS, Gonçalves BB, da Silva SM, Lima ECO et al. 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 et al. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) infected and not infected with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* **222**:106067 (2021).
 - 44 Teles HMS and Carvalho OS. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose, in *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar, ed. by Carvalho OS and Coelho PMZ. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, pp. 459–484 (2008).
 - 45 Alberto-Silva AC, Cunha RA, Costa VAD, Santos EGN, Vasconcelos MC, Mello-Silva CC et al. Behavioral response of *Biomphalaria glabrata* exposed to a sublethal concentration of euphorbia milleriana. *Histopii latex. An Acad Bras Cienc* **92**: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> [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, Júnior 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**:189–201 (2020).
 - 49 Galloway TS and Depledge MH. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* **10**: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**:193–197 (1993).
 - 51 Russo J and Madec L. Hemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell Tissue Res* **328**:431–441 (2007).
 - 52 Ribeiro IATA, Sá JLF, Lima MV, Veras STS, JCROF A, Aires AL et al. Toxic effect of *Cratogeomys rufescens* 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 et al. 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 et al. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Environ Sci Pollut Res Int* **28**:69343–69353 (2021).
 - 56 Osman AM, Rottevel 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**:135–141 (2004).
 - 57 Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE and King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* **383**:2253–2264 (2014).
 - 58 Zhang SM and Coults 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 mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **9**:e0004290 (2015).

ANEXOS – NORMAS DA REVISTA - PEST MANAGEMENT SCIENCE

- Research Articles

All reported data should be original and previously unpublished. In most cases, experiments reported should be replicated and appropriately statistically analyzed.

Word Limit: 6000

- Main Document

The text file should be presented in the following order:

1. Title
2. Short running title (up to 80 characters)
3. Full names of all authors
4. Authors' institutional affiliations at which the work was carried out, (footnote for author's present address if different to where the work was carried out)
5. Abstract (up to 250 words) and keywords (4 to 6)
6. Introduction
7. Materials and Methods
8. Results
9. Discussion
10. Conclusion
11. Acknowledgments
12. Conflict of Interest Declaration
13. References
14. Tables (each table complete with title and footnotes)
15. Figure Legends

Submissions via the new Research Exchange portal can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.docx) format.

Supporting information and the graphical abstract should be supplied as separate files.