



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

JOÃO VICTOR RITINTO DA ROCHA

**EFEITOS TÓXICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DE *Cladonia substellata* SOBRE
Biomphalaria glabrata E CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni***

Recife

2022

JOÃO VICTOR RITINTO DA ROCHA

EFEITOS TÓXICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DE *Cladonia substellata* SOBRE
Biomphalaria glabrata E CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni*

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

Orientador (a): Dr. André de Lima Aires

Coorientador (a): Dr. Hallysson Douglas Andrade de Araújo

Coorientador (a): Dr^a. Hianna Arely Milca Fagundes Silva

Recife

2022

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Rocha, João Victor Ritinto da.

Efeitos tóxicos e morfofisiológicos de *Cladonia substellata* sobre *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni* / João Victor Ritinto da Rocha. - Recife, 2022.

107f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, 2022.

Orientação: André de Lima Aires.

Coorientação: Hallysson Douglas Andrade de Araújo.

Coorientação: Hianna Arely Milca Fagundes Silva.

Inclui referências e anexos.

1. *Cladonia substellata*; 2. *Biomphalaria glabrata*; 3. Moluscicida; 4. Embriotoxicidade; 5. Fecundidade e Fertilidade; 6. Hemócitos. I. Aires, André de Lima. II. Araújo, Hallysson Douglas Andrade de. III. Silva, Hianna Arely Milca Fagundes. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JOÃO VICTOR RITINTO DA ROCHA

EFEITOS TÓXICOS E MORFOFISIOLÓGICOS DE *Cladonia substellata* SOBRE
Biomphalaria glabrata E CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni*

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

Aprovada em: 03/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André de Lima Aires - Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza - Examinadora Interna
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Fernanda Miguel da Andrade - Examinadora Externa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Guedes da Silva Júnior - Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio durante os anos em que estive na universidade, desde a graduação até o mestrado.

Ao Prof. Dr. André de Lima Aires pelas orientações, paciência e amizade, além de todo conhecimento passado a mim.

Aos meus coorientadores, Dr. Hallysson Douglas de Andrade Araújo e Dra. Hianna Arely Milca Fagundes Silva por todo suporte durante os experimentos e auxílio durante a escrita do artigo e da dissertação.

A Prof^a Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo por ceder e fornecer toda estrutura necessária para realização dos experimentos que foram realizados no departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

A Prof^a Dra Luana Cassandra Breintebach Barroso Coelho pela revisão e correção do artigo em inglês e pelas orientações referentes ao conteúdo que foi apresentado na qualificação para melhoria da versão final da dissertação.

Ao Dr. Dewson Rocha pela realização de um experimento essencial a minha pesquisa.

A Juliana Ellen que me apoiou e me deu suporte em todos os momentos do mestrado, além de todo amor compartilhado durante anos de convivência.

Ao meu grande amigo, irmão e grande tricolor, Thierry Wesley, que esteve comigo em todos os momentos importantes na graduação e no mestrado. Pode contar comigo sempre!

A todos os amigos que a vida me deu e parceiros de laboratório, Wilza Wanessa, Letícia da Silva, Sávio Silas, Lucas Matheus, Emanuelle Maria, Ana Jhoice, Josenildo Batista, Débora Sarmiento e Alina Coriolano.

A todos os membros do grupo de pesquisa “Os Schistosomas”, que orientados pela Prof^a Dra. Mônica Camelo e pelo Prof. Dr. André de Lima Aires, realizam ótimos trabalhos com união e companheirismo.

Ao Departamento de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

E a CAPES por apoio financeiro ao longo dos dois anos de mestrado.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária tropical que afeta, na grande maioria, populações em condições de pobreza. No Brasil, a esquistossomose é endêmica em estados da região Nordeste, incluindo Pernambuco. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são fundamentais para o ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*, portanto, uma das principais formas de controle da doença se dá pelo controle dos hospedeiros intermediários, destacando *B. glabrata*. A niclosamida é o único moluscida autorizado pela OMS, contudo, esta substância apresenta custo elevado de aplicação e provoca danos ao meio ambiente. Desta forma, é fundamental a busca por compostos de origem natural com propriedades moluscidas que possuam baixa toxicidade ao ambiente. Neste trabalho, objetivamos avaliar as atividades moluscida e antiparasitária do extrato etéreo do líquen *Cladonia substellata* contra embriões e adultos *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*. Parâmetros de toxicidade foram avaliados em doses subletais do extrato etéreo de *C. substellata* sobre a fertilidade/fecundidade de caramujos adultos, bem como os danos genotóxicos e alterações morfológicas nos hemócitos. Para o ensaio de toxicidade ambiental foi utilizado o bioindicador *Artemia salina*. As análises cromatográficas do extrato etéreo de *Cladonia substellata* revelaram a presença dos ácidos estíptico (4,12%), nortístico (2,14%) e úsnico (92,58%). Extrato etéreo de *C. substellata* apresentou toxicidade contra todos os estádios embrionários com CL₅₀ de 1,59, 2,47, 3,39, 2,36 e 0,92 µg/mL para blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage, respectivamente. A CL₅₀ para adultos *B. glabrata* foi de 2,11 µg/mL e o extrato alterou o padrão de fecundidade, reduzindo o número de embriões/caramujo. O extrato aumentou o número de células com morfologia indicativa de apoptose e a frequência e índice de danos ao DNA de hemócitos. Redução na motilidade de cercárias expostas ao extrato etéreo de *C. substellata* foi observada a partir de 2,5 µg/mL após 15 min e mortalidade de 100% é alcançada em 5,0 µg/mL após 120 min. Sobre *A. salina* o extrato etéreo de *C. substellata* foi atóxico nas concentrações avaliadas (1.0 - 5.0 µg/mL). O extrato etéreo de *C. substellata* é um promissor moluscida no controle populacional de embriões e adultos *B. glabrata*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. O extrato causou danos hemocitários e genotóxicos em caramujos adultos, apresentou ação contra cercárias, fase infectante para o hospedeiro definitivo, o homem, e foi atóxica contra *A. salina*.

Palavras-chave: *Cladonia substellata*; *Biomphalaria glabrata*; Moluscida; Embriotoxicidade; Fecundidade e Fertilidade; Hemócitos.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a tropical parasitic disease that affects, in the vast majority, populations in conditions of poverty. In Brazil, schistosomiasis is endemic in states of the Northeast region, including Pernambuco. Snails of the genus *Biomphalaria* are fundamental to the biological cycle of *Schistosoma mansoni*, therefore, one of the main ways of controlling the disease is through the control of intermediate hosts, highlighting *B. glabrata*. Niclosamide is the only molluscicide authorized by the WHO, however, this substance has a high cost of application and causes damage to the environment. Thus, it is essential to search for compounds of natural origin with molluscicidal properties that have low toxicity to the environment. In this work, we aimed to evaluate the molluscicidal and antiparasitic activities of the ethereal extract of the lichen *Cladonia substellata* against embryos and adults *Biomphalaria glabrata* and cercariae of *Schistosoma mansoni*. Toxicity parameters were evaluated at sublethal doses of the ethereal extract of *C. substellata* on the fertility/fecundity of adult snails, as well as genotoxic damage and morphological changes in hemocytes. For the environmental toxicity test, the bioindicator *Artemia salina* was used. Chromatographic analysis of the ethereal extract of *Cladonia substellata* revealed the presence of styctic (4.12%), norstictic (2.14%) and usnic (92.58%) acids. Ethereal extract of *C. substellata* showed toxicity against all embryonic stages with LC₅₀ of 1.59, 2.47, 3.39, 2.36 and 0.92 µg/mL for blastula, gastrula, trocophore, veliger and hippo stage, respectively. The LC₅₀ for *B. glabrata* adults was 2.11 µg/mL and the extract altered the fecundity pattern, reducing the number of embryos/snail. The extract increased the number of cells with morphology indicative of apoptosis and the frequency and rate of DNA damage in hemocytes. Reduction in the motility of cercariae exposed to the ethereal extract of *C. substellata* was observed from 2.5 µg/mL after 15 min and 100% mortality is reached at 5.0 µg/mL after 120 min. On *A. salina*, the ethereal extract of *C. substellata* was non-toxic at the concentrations evaluated (1.0 - 5.0 µg/mL). The ethereal extract of *C. substellata* is a promising molluscicide for population control of embryos and adults of *B. glabrata*, the intermediate host of *S. mansoni*. The extract caused hemocytic and genotoxic damage in adult snails, showed action against cercariae, an infective phase for the definitive host, man, and was non-toxic against *A. salina*.

Keywords: *Cladonia substellata*; *Biomphalaria glabrata*; Molluscicidal; Embryotoxicity; Fecundity and Fertility; Hemocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição mundial da esquistossomose.	16
Figura 2 –	Distribuição das principais espécies de <i>Schistosoma</i> spp no mundo.	17
Figura 3 –	Áreas endêmicas para esquistossomose mansônica no Brasil.	18
Figura 4 –	Municípios pernambucanos classificados em endêmico, focal e vulnerável de acordo com o número de casos de esquistossomose.	18
Figura 5 –	Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .	20
Figura 6 –	Caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> .	21
Figura 7 –	Distribuição geográfica das Espécies de <i>Biomphalaria</i> spp no Brasil.	23
Figura 8 –	Estádios de desenvolvimento embrionário de <i>B. glabrata</i> .	25
Figura 9 –	Morfologia dos Líquens.	26
Figura 10 –	Tipos de Líquens.	27
Figura 11 –	Talo de <i>Cladonia Substellata</i> Vainio.	29
Figura 12 –	Estrutura química do ácido úsnico e seu enantiômero.	30
Figura 13 –	Cristais de ácido úsnico.	31
Figura 14 –	<i>Artemia salina</i> .	32
Artigo		
Figura 1 –	Toxicidade do extrato etéreo de <i>C. substellata</i> sobre estádios embrionários de <i>B. glabrata</i> .	90
Figura 2 –	Estágios embrionários de <i>B. glabrata</i> expostos a 0,5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em água filtrada e dechlorada (A-E, 40x), Niclosamida a 1µg/mL de (F-J, 40x) e extrato etéreo de <i>C. Substellata</i> em diferentes concentrações (K - O, 40x).	91
Figura 3 –	Mortalidade e fecundidade de adultos <i>B. glabrata</i> .	92
Figura 4 –	Hemócitos de <i>B. glabrata</i> expostos ao extrato	93

	etéreo de <i>C. substellata</i> .	
Figura 5 –	Alterações morfológicas e quantitativas de hemócitos de <i>B. glabrata</i> expostos ao extrato etéreo de <i>C. substellata</i> .	94
Figura 6 –	Imagens do ensaio cometa obtidas de hemócitos de <i>B. glabrata</i> , coradas com Sybrsafe™ e danos no DNA após exposição a diferentes concentrações de extrato etéreo de <i>C. substellata</i> .	95
Figura 7 –	Cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> .	96
Figura 8 –	Toxicidade do extrato etéreo de <i>C. substellata</i> sobre o bioindicador <i>A. salina</i> após 24 h de exposição.	97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Lethal concentrations (LC) of ethereal extract of *C. substellata* ($\mu\text{g/mL}$) after 24 h of exposure on embryos and adults of *B. glabrata*. 88
- Tabela 2 – Mortality of cercariae of *S. mansoni* exposed to ether extract of *Cladonia substellata* 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Belo Horizonte
CL	Concentração letal
CO ₂	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FD%	Damage Frequency
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ID	Damage index
LC	Letal concentration
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCL	Niclosamida
N ₂	Nitrogênio
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
O ²⁻	Superóxido
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PZQ	Praziquantel
R _f	Fator de retenção
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
R _t	Tempo de retenção
TLC	Cromatografia em camada delgada
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Aspectos epidemiológicos da esquistossomose	16
2.2	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
2.3	Hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil	20
2.3.1	Estágios e características dos embriões do gênero <i>Biomphalaria</i> <i>spp</i>	23
2.4	Líquens: características gerais e propriedades biológicas	25
2.4.1	Substâncias liquênicas	28
2.4.2	<i>Cladonia substellata</i> Vainio	29
2.5	Testes ecotoxicológicos	31
2.5.1	Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Coleta de <i>Cladonia substellata</i>	35
4.2	Preparação do extrato etéreo de <i>Cladonia substellata</i>	35
4.3	Cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência	35
4.4	Bioensaio	36
4.4.1	Obtenção do <i>Biomphalaria glabrata</i>	36
4.4.2	Ensaio de embriotoxicidade de <i>B. glabrata</i>	36
4.4.3	Ensaio de toxicidade em <i>B. glabrata</i> adultos	37
4.4.4	Avaliação citotóxica sobre hemócitos de <i>B. glabrata</i>	38
4.4.5	Ensaio cometa	38
4.4.5.1	Análise de microscopia de fluorescência	39
4.4.6	Ensaio de toxicidade com cercárias de <i>S.mansoni</i>	40
4.4.7	Ecotoxicidade ambiental em <i>Artemia salina</i>	40
4.5	Análises estatísticas	41
5	RESULTADOS	42

	ARTIGO - <i>Cladonia substellata</i> (Lichen): Toxicological, cytotoxic and genotoxic effects on the developmental stages of <i>Biomphalaria glabrata</i> and <i>Schistosoma mansoni</i> cercariae	42
6	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXO 1 – Carta de submissão	107

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma spp.* que prevalece em condições de pobreza, afetando em maior dimensão populações de baixa renda em regiões tropicais e subtropicais. Presente em 78 países na África, Ásia e Américas do sul e central, é a segunda parasitose mais prevalente no mundo, colocando em risco de infecção mais de 700 milhões de pessoas e acometendo outras 240 milhões; destas, aproximadamente 200.000 evoluem para o óbito todos os anos (WHO, 2017; MORAES et al., 2019; WHO, 2020). O Brasil é um dos países com as maiores taxas de morbimortalidade da doença, tendo sido registrado entre os anos de 2000 a 2017 mais de 9 mil óbitos por esquistossomose. A espécie encontrada no país é o *S. mansoni*, que tem como principal vetor caramujos *Biomphalaria glabrata* em função da alta suscetibilidade e ampla distribuição (PARAENSE, 1986; BRASIL, 2018).

Muitos programas de controle da esquistossomose se concentram na prevenção através do tratamento dos pacientes, embora importante, essa estratégia é insuficiente para controlar a transmissão da doença (KING; BERTSCH, 2015). Sendo assim, para controle da esquistossomose o uso de agentes moluscidas para combater os hospedeiros intermediários, administração em massa de medicamentos, saneamento básico e educação em saúde constituem alternativas viáveis (KARIUKI et al., 2013; INOBAYA et al., 2014).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a utilização do moluscida sintético Niclosamida (NCL), composto sintético eficaz contra caramujos adultos e embriões de diversas espécies de hospedeiros intermediários e cercárias de *Schistosoma spp* (WHO, 2017). Apesar da sua eficácia, esta droga possui alto custo associado à aplicação, sensibilidade à luz solar, alta toxicidade para animais e plantas aquáticas, além de muitas populações de caramujos desenvolverem resistência (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000; CHEN et al., 2012). Portanto, a busca por substâncias de origem natural, atóxicas, com atividade moluscida e cercaricida se torna urgente para impedir a transmissão da esquistossomose (LUNA et al., 2005; MIYASATO et al., 2012).

Neste sentido, os líquens, uma associação simbiótica entre um micobionte (fungo) e um fotobionte (alga /cianobactéria), são candidatos a potenciais produtos

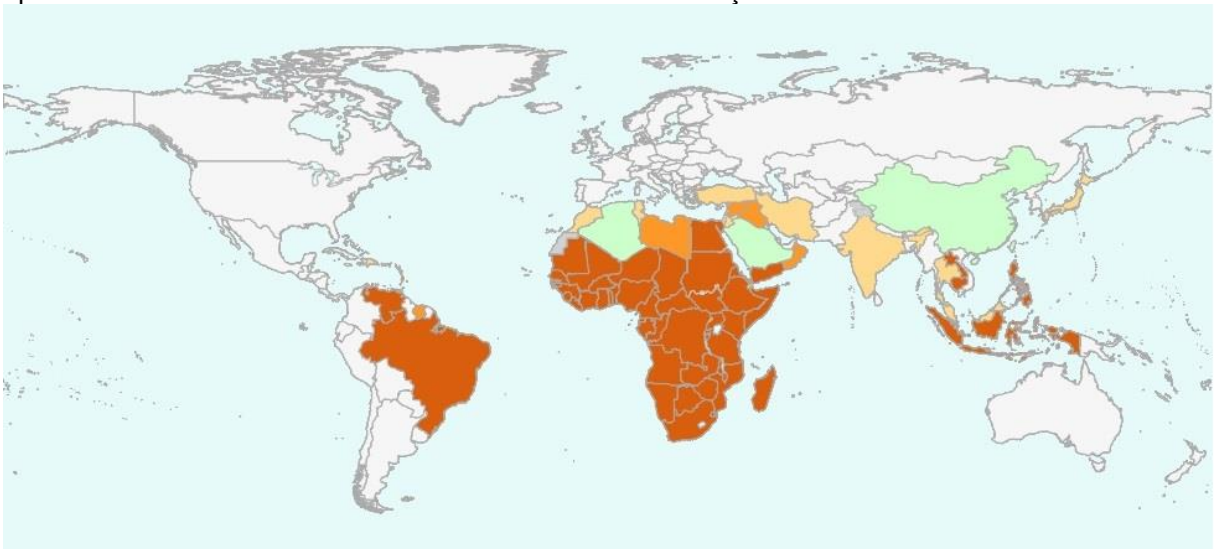
moluscidas por produzirem uma série de metabólitos secundários com propriedades biológicas, incluindo ação antimicrobiana (KARABACAK, TAY, KIVANC, 2014), anti-tumoral (RUSSO et al., 2012), antinociceptivo (ARAÚJO et al., 2019), antioxidante (FERNÁNDEZ-MORIANO et al., 2016), anti-inflamatório (BUGNI et al., 2009), anti-parasitária (LUZ et al., 2015) e moluscida (MARTINS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2019). Portanto, com base nessas propriedades este estudo explorou pela primeira vez a toxicidade do extrato etéreo de *C. substellata* sobre embriões (estágio de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage) e adultos *B. glabrata*, seu efeito citotóxico e genotóxico sobre hemócitos, atividade sobre cercárias de *S. mansoni* e avaliação ecotoxicológica sobre o bioindicador *Artemia salina*. Este estudo ampliará o escopo de aplicação do extrato etéreo de *C. substellata* e fornecerá uma nova alternativa no controle populacional de caramujos vetores da esquistossomose mansoni.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes digenéticos do gênero *Schistosoma spp.* A doença atinge principalmente populações de baixa renda em situações de pobreza que não tem acesso à água potável e saneamento básico adequado, sendo estes fatores determinantes para a manutenção do ciclo de vida do parasito (FACCHINI et al., 2018; ATALABI; ADUBI, 2019; BRASIL, 2020). Atrás apenas da malária, a esquistossomose é considerada a parasitose mais importante em termos socioeconômicos e de saúde pública no mundo, afetando cerca de 240 milhões de pessoas e colocando em risco de infecção outras 779 milhões. Devido a sua ampla distribuição geográfica, a esquistossomose é relatada em 78 países e territórios de clima tropical e subtropical, destes, 52 países são endêmicos para a doença (Figura 1) (SILVA-MORAES et al., 2019; WHO, 2020;).

Figura 1. Distribuição mundial da esquistossomose. Os países marcados em tom de cor mais escuro apresentam os maiores índices de morbimortalidade da doença.

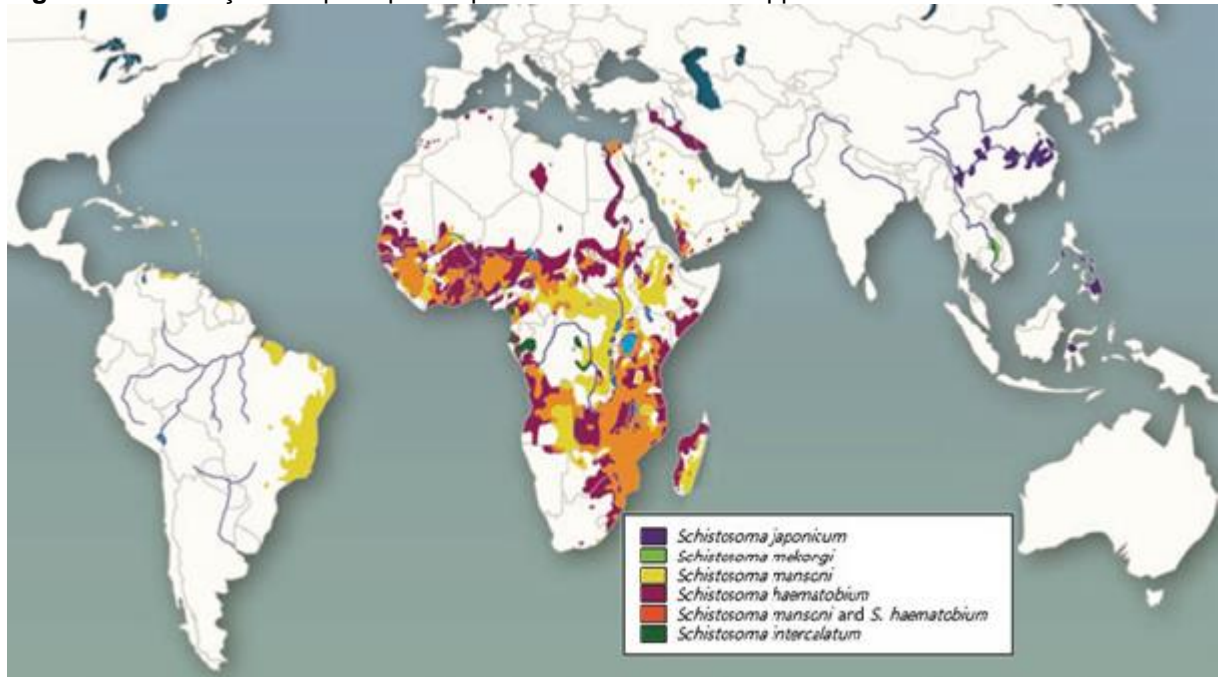


Fonte: WHO (2018).

As espécies mais importantes causadoras da esquistossomose humana no contexto epidemiológico mundial são *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*, estas, são responsáveis pelas maiores taxas de morbimortalidade da doença. Já as espécies *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. guineenses* apesar de terem certa importância epidemiológica apresentam uma baixa prevalência global (Figura 2). Com exceção do *S. haematobium*, causador da forma urogenital da doença, todas

as outras espécies causam a forma intestinal da esquistossomose (GAHI, 2018; SCHWARTZ; FALLON, 2018; MCMANUS et al., 2018).

Figura 2. Distribuição das principais espécies de *Schistosoma* spp no mundo.

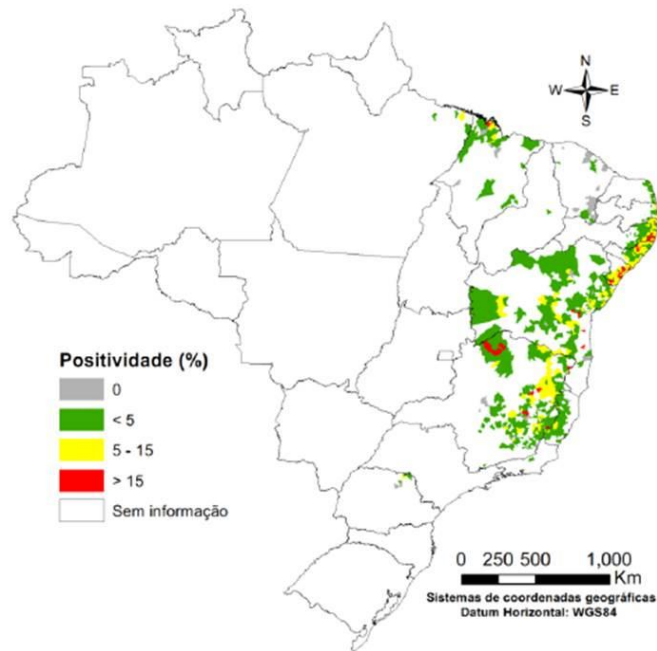


Fonte: JUNG et al. (2019).

Dentre as espécies citadas, *S. mansoni* é a única presente nas Américas Central e do Sul, onde, algumas ilhas do Caribe (República Dominicana, Guadalupe e Santa Lúcia), Suriname, Venezuela e Brasil são endêmicos para esta parasitose (NOYA et al., 2015; KATZ, 2018). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), aproximadamente 25 milhões de pessoas correm risco de contrair a infecção nesses locais, com Brasil e Venezuela sendo os países mais atingidos pela doença.

No Brasil, a esquistossomose mansônica também conhecida popularmente como “xistose”, “barriga d’água” ou “doença dos caramujos” atinge aproximadamente 1,5 milhão de pessoas, sendo registrados pelo Ministério da Saúde entre os anos 2000 e 2017, mais de 9.000 óbitos. A transmissão da esquistossomose é relatada em 19 Estados, sendo endêmica em Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, além de apresentar transmissão focal no Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Distrito Federal (Figura 3) (KATZ, 2018; BRASIL, 2020).

Figura 3. Áreas endêmicas para esquistossomose mansônica no Brasil.



Fonte: SISPCE/SVS/MS (2018).

Na região Nordeste, Pernambuco é um dos estados que se destaca pelos altos índices de infecção pela esquistossomose, no qual dos 185 municípios que o compõem, 101 (54,6%) são endêmicos para a doença (Figura 4). De 2013 a 2017, o estado apresentou média anual de 150 óbitos, além disso, no mesmo período, foi descrita uma média de internações hospitalares de 39 pacientes ao ano, decorrente das formas mais graves da doença (BARBOSA et al., 2018; PERNAMBUCO, 2018).

Figura 4. Municípios pernambucanos classificados como endêmico, focal e vulnerável de acordo com o número de casos de esquistossomose.



Fonte: PERNAMBUCO (2018).

2.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

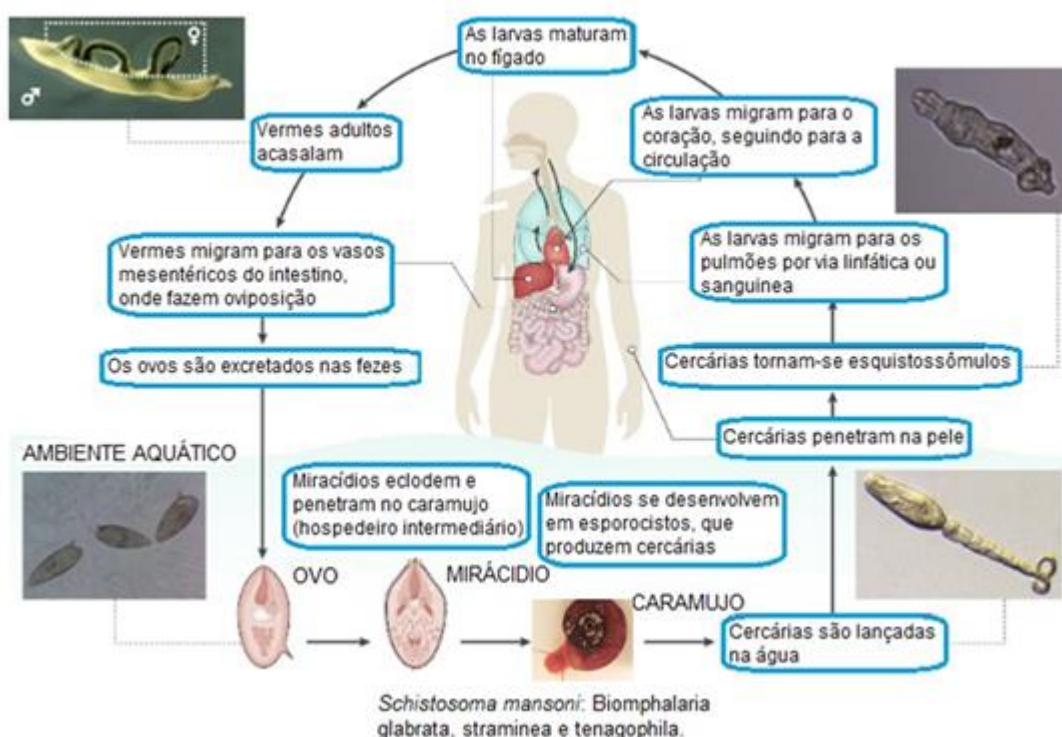
O *S. mansoni* tem ciclo de vida do tipo heteroxênico, necessitando de um hospedeiro intermediário durante a fase assexuada, os caramujos do gênero *Biomphalaria spp*, e um hospedeiro definitivo durante a fase sexuada, que são os humanos e outros mamíferos (LEWIS; TUCKER, 2014; BRASIL, 2018).

O ciclo inicia quando indivíduos infectados excretam suas fezes contendo ovos maduros. Ao entrar em contato com águas doces, os ovos por estímulos de luz intensa e temperatura liberam uma larva ciliada, o miracídio. Este se movimenta ativamente em busca do hospedeiro intermediário, o caramujo *Biomphalaria spp*. (INOBAYA et al., 2014; BRASIL, 2018; MCMANUS et al., 2018). Ao encontrá-lo, o miracídio se fixa ao tegumento do caramujo realizando a penetração através de movimentos contráteis e rotatórios. No processo de penetração, o miracídio perde algumas estruturas dentro de um período de aproximadamente 48 horas, sofrendo diversas modificações morfofisiológicas para se diferenciar em um “saco” formado por uma membrana contendo células germinativas, denominado esporocisto primário. Após esta fase, o esporocisto primário vai dar origem ao esporocisto secundário e depois ao terciário para originar as cercárias, que são as formas infectantes para hospedeiro vertebrado. Neste processo um miracídio pode dar origem até a 300.000 cercárias de um único sexo (GRYSEELS, 2012; NEVES, 2016; ALMEIDA, 2018; MCMANUS et al., 2018).

Após 40 a 45 dias de penetração do miracídio, as cercárias são liberadas pelos caramujos no ambiente aquático. Essa liberação ocorre preferencialmente entre as 10-16 horas, isto ocorre devido ao calor mais intenso e uma maior incidência de luz. Após a liberação, as cercárias nadam ativamente até encontrarem um hospedeiro definitivo, quando isso acontece penetram na pele e/ou mucosas do indivíduo por esforço mecânico e pela atuação de enzimas proteolíticas (GRYSEELS, 2012; BRASIL, 2018). Ao realizarem a penetração, as cercárias sofrem alterações metabólicas e reorganizam seus tegumentos passando a ser chamadas de esquistossômulos de pele. Estes migram até os vasos sanguíneos e chegam aos pulmões, depois seguem para o coração, e posteriormente para o fígado, nos ramos intra-hepáticos onde vão completar seu desenvolvimento em vermes adultos até alcançarem a maturação sexual. No sistema porta intra-hepático

os vermes adultos, macho e fêmea acasalam e migram para as veias mesentéricas inferiores iniciando a oviposição. A fêmea de *S. mansoni* pode liberar cerca de 300/400 ovos por dia, sendo que parte desses ovos chega à luz intestinal onde serão liberados juntos às fezes dando continuidade ao ciclo, outra parte fica retida na mucosa intestinal ou embolizados para o fígado e baço pela circulação portal (Figura 5) (NEVES, 2016; BRASIL, 2018; LOYO, 2018).

Figura 5. Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Adaptado de MCMANUS et al. (2018).

2.3 Hospedeiros Intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil

Os hospedeiros intermediários transmissores do *S. mansoni* no Brasil são caramujos gastrópodes aquáticos, pulmonados e hermafroditas. De acordo com estas e outras características, estes caramujos tem a seguinte classificação taxonômica: Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae e Gênero *Biomphalaria* (NEVES, 2016; BRASIL, 2017). No país são encontradas 11 espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* que são: *B. glabrata* (SAY, 1818), *B. tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835), *B. straminea* (DUNKER, 1848), *B. amazônica* (PARAENSE, 1966), *B. peregrina* (D'ORBIGNY, 1835), *B. cousini* (PARAENSE, 1966); *B. intermedia* (PARAENSE &

DESLANDES, 1962), *B. kuhniiana* (CLESSIN, 1883), *B. schrammi* (CROSSE, 1864), *B. oligoza* (PARAENSE, 1975), *B. occidentalis* (PARAENSE, 1981) e *B. tenagophila* guaibensis (PARAENSE, 1984). Dentre estas, apenas as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* estão envolvidas na transmissão da esquistossomose mansônica, uma vez que são naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*. Já as espécies *B. amazônica* e *B. peregrina*, são hospedeiras em potencial e todas as outras não são hospedeiras do *S. mansoni* (NEVES, 2016).

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* apresentam características em comum que permitem uma fácil identificação como, uma concha bicôncava planispiral com diâmetro variando entre 7 mm e 40 mm dependendo da espécie; a cor natural da concha é castanha, mas pode variar devido as condições ambientais, passando por vários tons de marrom até o negro (Figura 6). Apresentam também tentáculos longos e filiformes, com os olhos localizados na base dos tentáculos, pé oblongo, boca contornada pela mandíbula em forma de T, hemolinfa vermelha pela presença de hemoglobina, abertura genital masculina localizada atrás da base do tentáculo esquerdo e a abertura genital feminina mais atrás, sob a pseudobrânquia (PARAENSE, 2008; BRASIL, 2008; NEVES, 2016).

Figura 6. Caramujo *Biomphalaria glabrata*



Fonte: O autor.

A capacidade de colonização de caramujos *Biomphalaria spp* é dependente de condições que envolvam ambientes hídricos naturais ou artificiais de águas doces paradas e/ou pouco movimentadas, somando-se a estes fatores, uma boa luminosidade e temperatura, presença de matéria orgânica, pH neutro, baixa salinidade e microflora rica favorecem a reprodução dos caramujos nestes locais. E

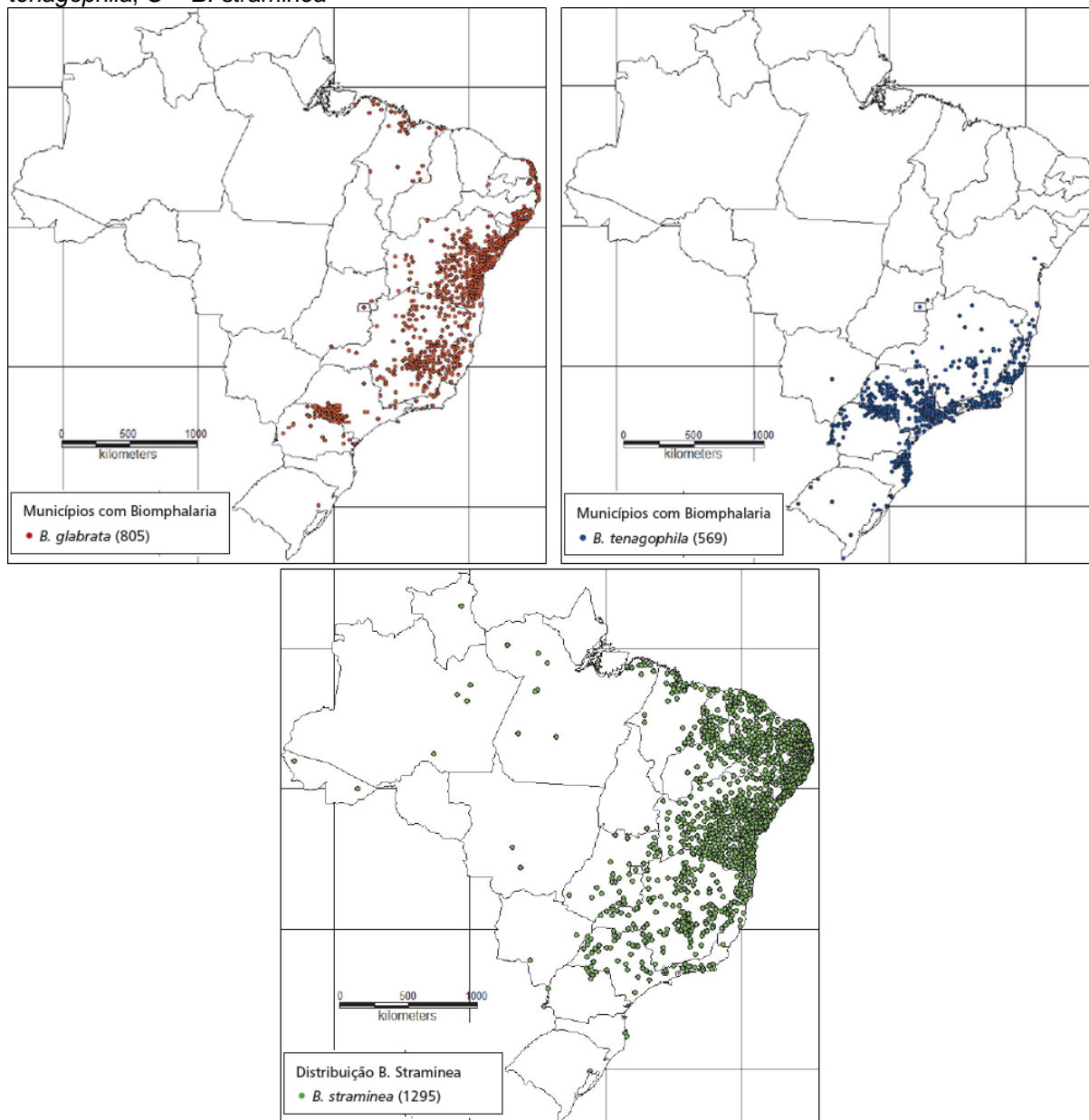
uma de suas características importantes é a capacidade de se reproduzir de duas formas, a primeira é devido ao hermafroditismo, no qual através da autofecundação um único espécime de *B. glabrata* pode gerar em 90 dias até 10 milhões de embriões, e a outra através da fecundação cruzada, sendo a preferencial por resultar em variabilidade genética (PARAENSE, 2008; PIERI et al., 2012; NEVES, 2016).

Quanto à distribuição geográfica dos caramujos vetores do *S. mansoni*, a espécie *B. glabrata* pode ser encontrada no Brasil nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe (Figura 7A). É considerada a espécie mais importante devido a sua alta suscetibilidade frente a diversas cepas do *S. mansoni*, sendo assim o mais eficiente transmissor da esquistossomose (PARAENSE, 1986; BRASIL, 2016).

O *B. tenagophila* pode ser encontrado na Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, além do Distrito Federal. Esta espécie distribui-se através de uma faixa litorânea do Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul abrangendo também uma área mais densa de distribuição nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e de Santa Catarina, além de avançar pelo oeste em Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Figura 7B) (BRASIL, 2008; CARVALHO et al., 2018).

O *B. straminea* é a espécie com maior distribuição geográfica no Brasil, estando presente em 24 estados e no Distrito Federal, apenas Roraima e Amapá não têm registros da presença do caramujo (Figura 7C). Os moluscos *B. straminea* são encontrados em quase todas as bacias hidrográficas brasileiras se adaptando as diversas variações climáticas e ecológicas do país. Na Região Nordeste, apresenta amplo domínio por estar mais bem adaptado ao clima seco, desempenhando papel importante na epidemiologia da esquistossomose. Apesar disso, esta espécie exibe os mais baixos níveis de infecção dentre as espécies vetoras da esquistossomose no Brasil (BRASIL, 2008; CARVALHO et al., 2018).

Figura 7. Distribuição geográfica das Espécies de *Biomphalaria spp* no Brasil. A – *B. glabrata*; B – *B. tenagophila*; C – *B. straminea*



Fonte: BRASIL (2014).

2.3.1 Estágios e características dos embriões do gênero *Biomphalaria spp*

O conhecimento a respeito da embriologia dos caramujos do gênero *Biomphalaria sp* é de grande importância, visto que a análise de compostos moluscicidas quando aplicadas nas fases iniciais de desenvolvimento do vetor podem diminuir a transmissão da esquistossomose (KAWANO et al., 2008).

Estudos realizados por Camey & Verdonk (1969) permitiram compreender a linhagem celular do *B. glabrata* desde as primeiras clivagens até a eclosão dos caramujos jovens. E a partir dos estudos complementares de Kawano et al., 1992 e

Kawano et al., 2004 foi possível descrever e identificar os estádios embrionários de desenvolvimento dos caramujos *Biomphalaria* sp.

As desovas de *Biomphalaria* sp são formadas por ovos que medem cerca de 100µm de diâmetro. Inicialmente cada embrião passa por diversas clivagens até alcançar o estágio de blástula e isto ocorre de 0 a 15 horas após a primeira clivagem (Figura 8A). Neste estágio ocorrem apenas divisões mitóticas sem o aumento de volume celular (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992). Após 24 horas da primeira clivagem, se inicia a gastrulação caracterizada pelo final da clivagem, início do crescimento, diferenciação e movimentação celular. A gastrulação nesses caramujos ocorre por invaginação ou endobolia. O embrião modifica sua forma de arredondada para achatada pela transformação dos pólos animal e vegetativo (Figura 8B). No final desta fase tem-se o aparecimento da boca (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992).

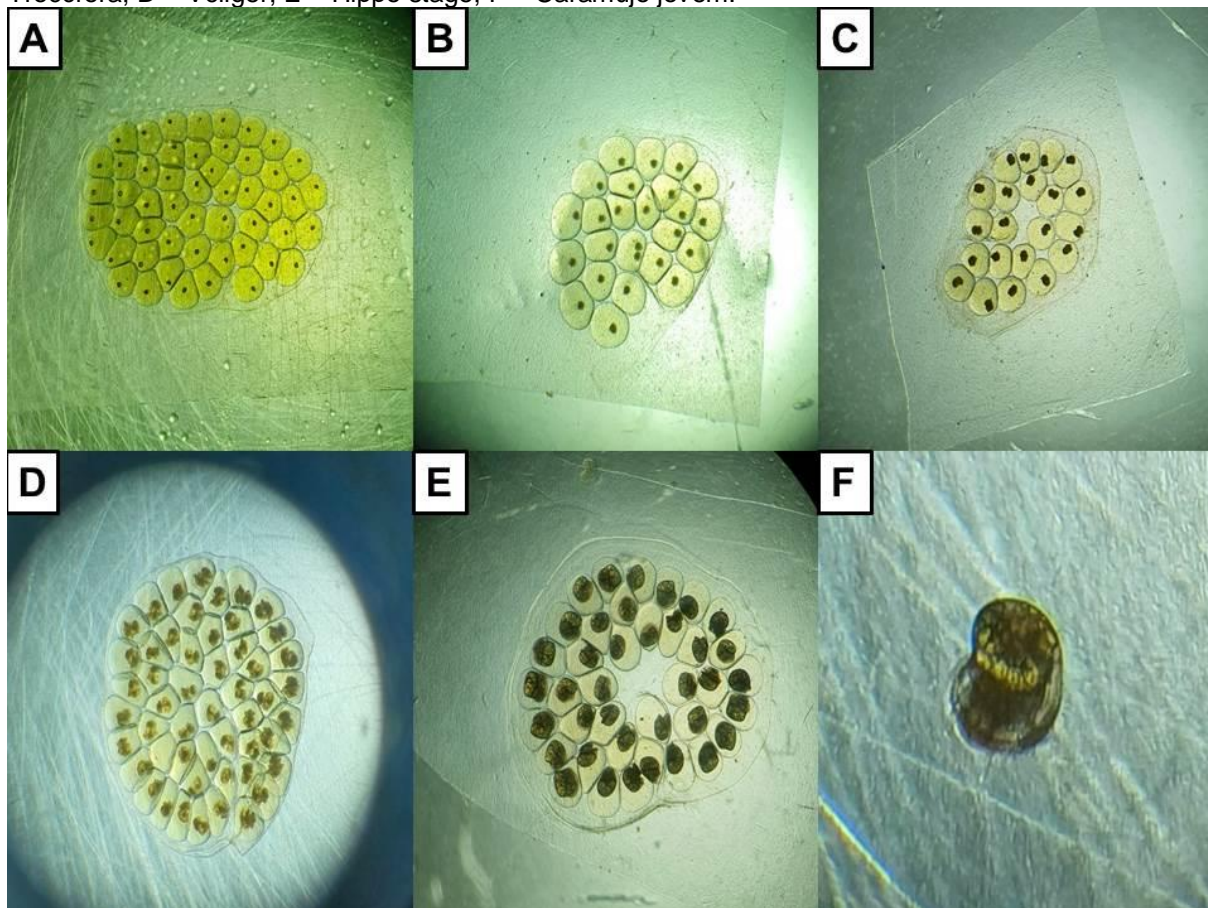
O estágio de trocófora (Figura 8C) ocorre entre 48 e 87 horas após a primeira clivagem, constituindo-se como a primeira fase larval de *B. glabrata*. Esta fase é caracterizada pela formação do prototroco, que separa o corpo larval em duas partes, as regiões pré-trocal e pós-trocal. Na região pré-trocal é encontrada a futura região cefálica, com a presença de uma placa apical, duas placas cefálicas que darão origem a região dos olhos e tentáculos, e a vesícula cerebral. Na região pós-trocal encontra-se a boca, localizada abaixo da placa apical e na região oposta encontra-se a glândula da concha (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO; NAKANO; WATANABE 2008).

O estágio de véliger que ocorre entre 96 e 120 horas após a primeira clivagem é caracterizado pela formação da concha, que começa a cobrir uma parte do corpo (Figura 8D). O prototroco evolui para um órgão que recebe nome de velum, que é responsável pela movimentação intensa da larva dentro do ovo e as placas cefálicas apresentam a futura região do olho e do tentáculo. Nesse estágio o pé já está bem desenvolvido (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO; NAKANO; WATANABE 2008).

Em hippo stage (Figura 8E), estágio entre 120 e 144 horas da primeira clivagem, os olhos e os tentáculos já estão bem desenvolvidos e são evidenciados como um halo pigmentado na região das placas cefálicas. A concha cobre quase toda a totalidade do corpo e do pé da larva formando quase um caramujo jovem. Após 144 horas, a uma temperatura de 25°C ocorre a eclosão dos caramujos jovens

(Figura 8F) (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RÉ 1992; KAWANO; NAKANO; WATANABE 2008).

Figura 8. Estádios de desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*. A – Blástula; B – Gástrula; C – Trocófora; D – Véliger; E – Hippo stage; F – Caramujo jovem.



Fonte: O autor.

2.4 Líquens: características gerais e propriedades biológicas

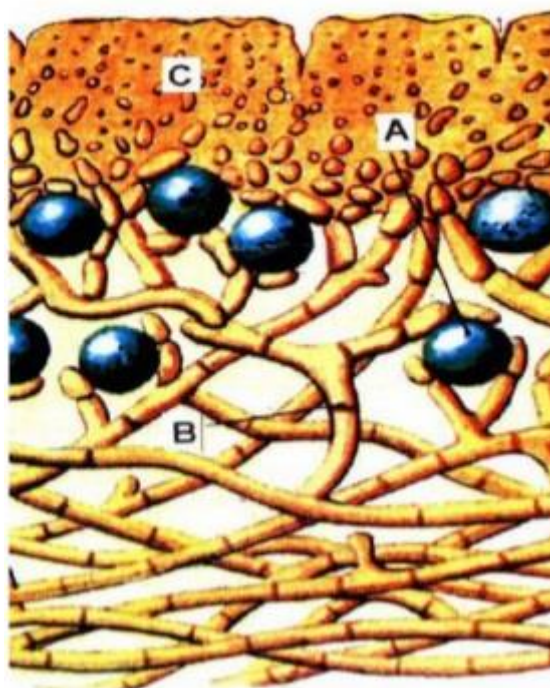
Os líquens, também chamados de fungos liquenizados, são organismos resultantes de uma associação simbiótica entre um fungo (micobionte, heterotrófico) e um ou mais participantes fotossintéticos (fotobionte, autotrófico), podendo ser algas verdes e/ou cianobactérias. Essa interação permanente leva a formação de um corpo vegetativo denominado talo no qual o fungo é um exohabitante (COCHIETTO et al., 2002; NASH III, 2008; KIRK et al., 2008).

Na associação entre esses organismos, o fungo obtém nutrientes produzidos pelas algas/cianobactérias que são compostos orgânicos (carboidratos) e oxigênio produzido através da fotossíntese, fundamentais para respiração e crescimento. Já

as algas/cianobactérias se beneficiam da presença do fungo por lhes conferir abrigo à luz excessiva e hidratação para se estabelecer em ambientes secos (NASH III, 1996; PURVIS, 2000; MOEL, 2008).

Quanto à morfologia dos líquens, baseia-se na organização do talo liquênico que tem suas características estruturais produzidas pelo micobionte. Esta estrutura é de suma importância para identificação dos líquens, pois a morfologia e a química do talo é um componente variante de cada espécie. Dentro do talo liquênico o fotobionte e o micobionte se posicionam em sucessivas camadas, onde o córtex superior é constituído de hifas entrelaçadas do fungo dando proteção à camada de algas posicionada mais abaixo, protegida por outro feixe de hifas frouxas, a medula, que é seguida de outro feixe de hifas, o córtex inferior (KAFFER, 2005; MOEL, 2008) (Figura 9).

Figura 9. Morfologia dos líquens. A – Alga; B – Hifas medulares; C – Hifas corticais.



Fonte: Pereira (1998).

O talo liquênico pode ser classificado em foliáceo ou folhoso, crostoso, arbustivo ou fruticoso e ainda, o talo esquamuloso, um tipo intermediário mais complexo entre o talo crostoso e o folhoso (NASH III, 1996; GOWARD et al., 1994; NASH III, 2008). Todos esses tipos apresentam cores características e formas variadas, que, como dito anteriormente dependem da espécie e das substâncias que eles contêm (PEREIRA, 2002).

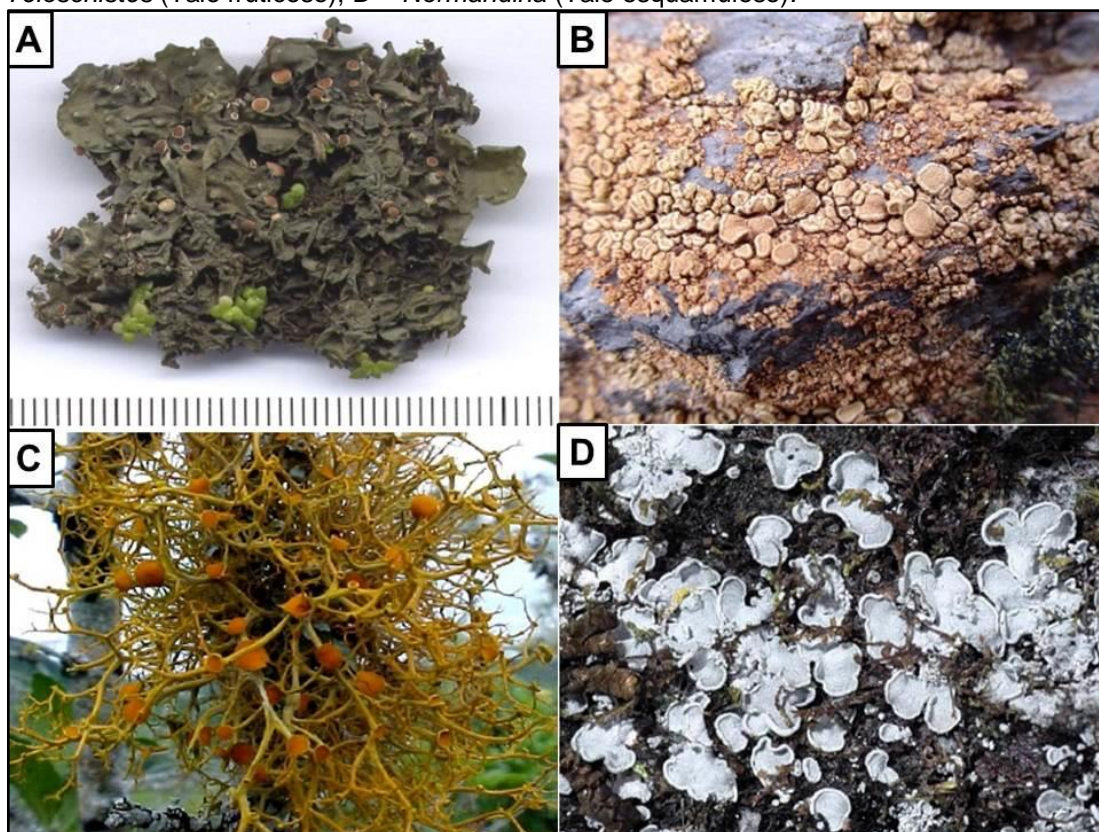
.O talo foliáceo ou folhoso é semelhante a uma folha sobre um substrato e dele se destaca com facilidade. Além disso, esse tipo de talo apresenta-se dividido lobos e sua fixação ao substrato ocorre através das rizinas (HALE JÚNIOR, 1983; NASH III, 2008) (Figura 10A).

O talo crostoso apresenta-se intimamente aderido ao substrato pela medula, sendo difícil destaca-lo. Tem uma estrutura anatômica bem diferenciada e achatada formando uma espécie de crosta (NASH III, 1996; XAVIER FILHO et al., 2006) (Figura 10B).

O talo fruticoso ou arbustivo assemelha-se a pequenos arbustos podendo se apresentar nas formas cilíndrica e achatada, ereto ou decumbente com de simetria radial ou isolateral. A fixação ao substrato ocorre por um ou mais pontos do ramo (HALE JÚNIOR, 1983; NASH III, 2008) (Figura 10C).

Já o talo esquamuloso é formado a partir de pequenos lóbulos que se assemelham a escamas agregadas aos talos. A estrutura é a mesma do tipo folioso, com exceção da ausência de rizina, estando fixado ao substrato através de uma porção central do córtex inferior (NASH III, 2008) (Figura 10D).

Figura 10. Tipos de Líquens. A – *Leptogium* sp (Talo folioso); B – *Ochrolechia parella* (Talo crostoso); C – *Teloschistes* (Talo fruticoso); D – *Normandina* (Talo esquamuloso).



Fonte: A, B, C – Spielmann (2006); D – Lucking et al., (2004).

Os líquens desempenham funções com grande importância ecológica atuando na formação, fertilização e prevenção da degradação do solo. Algumas dessas funções se dão pela capacidade de fixar o nitrogênio em ecossistemas áridos, constituindo grande parte da biomassa de organismos autotróficos em ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes (WILL-WOLF et al., 2004; NASH III, 2008; OZVAN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015).

Economicamente, os líquens também possuem muitas utilidades como, sua utilização em indústrias de cosméticos, tingimento de tecidos, na alimentação e na medicina popular, sendo utilizado devido as suas propriedades anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana (HUNECK, 1999; BATTS; CALDER; BATTS, 2004; MARTINS, 2013). Ademais os líquens são ótimos bioindicadores de poluição, com capacidade de armazenar contaminantes atmosféricos em suas células, configurando-se como excelentes modelos de monitoramento do ar (HONDA; VILEGAS, 1998; SOARES et al., 2014).

2.4.1 Substâncias liquênicas

Os líquens são fontes de compostos fenólicos que são produzidos por três vias biossintéticas, são elas: via acetato-polimalonato, via do ácido chiquímico e via do ácido mevalônico (NASH III, 2008). Através destas vias metabólicas, são formadas várias moléculas que quando isoladas possuem amplas atividades biológicas e farmacológicas (MULLER, 2001). Dentre os compostos isolados estão os ácidos graxos, depsídeos, depsidonas, compostos aromáticos, éteres difenil e dibenzofuranos (CULBERSON, 1972, NUNES, 2011).

As substâncias químicas que são resultantes do metabolismo dos líquens são classificadas em produtos intra e extracelulares, e esta classificação é dada de acordo com a localização no talo onde a substância é biossintetizada. Os produtos intracelulares produzidos a partir do metabolismo primário são constituídos pelos carboidratos, carotenoides, aminoácidos, proteínas, vitaminas e glicolípídeos. Já os produtos extracelulares resultantes do metabolismo secundário, compõem as denominadas substâncias liquênicas que são representadas pelos ácidos picrolíquênico, lecanórico, salazínico, fumarprotocetárico, protocetárico, úsnico, etc. (ELIX, 1996; NASH III, 1996; HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999).

Todas essas substâncias líquênicas cumprem um papel importante na adaptação dos líquens as mais diversas condições ambientais e, além disso, possuem diversas propriedades biológicas importantes como, ação antifúngica, antitumoral, antioxidante, antibacteriana, entre outras (EINARSDÓTTIR, et al., 2010; BACKOROVÁ et al., 2012; BYEON et al., 2012; SAHIN et al., 2015).

2.4.2 *Cladonia substellata* Vainio

Os líquens da espécie *Cladonia substellata* (Figura 11) foram descritos pela primeira vez em 1887 por Vainio, sendo estudada posteriormente em 1973 por Ahti. Encontram-se na família Cladoniaceae, considerada a mais representativa dentre as incluídas nos líquens Cladoniformes. Esta família pertence à Ordem Lecanorales e está posicionada dentro da classe dos Ascomycetes. Ainda, tem como fotobionte algas verdes unicelulares e talos característicos de formas e cores variadas que evoluem para uma forma arbustiva (AHTI; XAVIER-FILHO, 1993; SILVA, 2006).

Figura 11. Talo de *Cladonia Substellata* Vainio.



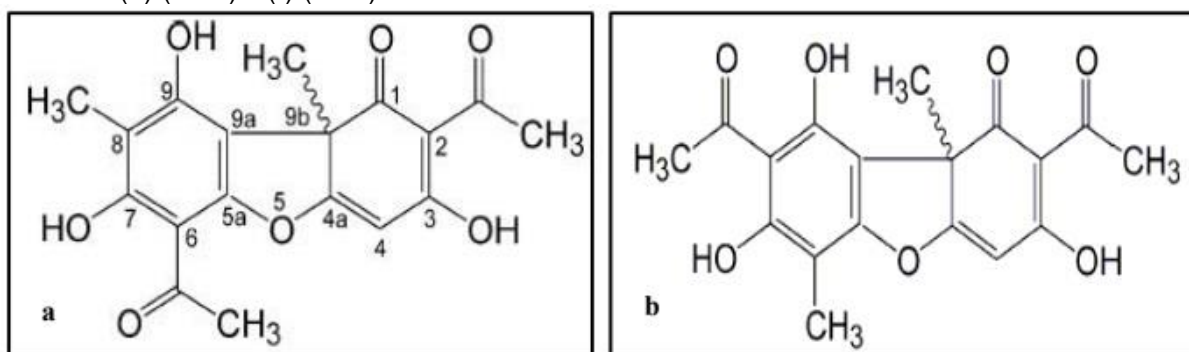
Fonte: Barbosa (2009).

A *Cladonia substellata* tem ocorrência em áreas mais expostas, sobre solos arenosos ou sobre rochas em decomposição (SEAWARD, 1977). No território brasileiro pode ser encontrada nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Minas Gerais e Rio grande do Sul. Esta também é facilmente identificada devido a sua morfologia, com podécios (talos) delgados e dicotômicos e sua coloração verde-amarelada, igual a do ácido úsnico, sua principal substância líquênica (PEREIRA, 1989; AHTI, 2000).

Além da sua composição morfológica, a composição química permite que a *Cladonia substellata* esteja inserida na seção Uniciales por possuir 98,1% de ácido úsnico, que tem propriedades biológicas bastante diversificadas (AHTI et al., 1993). Por esse motivo o ácido úsnico é o metabólito liquênico mais estudado, desde que foi isolado pela primeira vez em 1843 por Rochleder & Heldt de *Ramalina calicaris*, *Usnea barbata* e outras espécies de líquens (VICENTE, 1975).

De nome químico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3-(2H, 9 α / β H)-dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇] o ácido úsnico pode ser isolado de líquens dos gêneros *Usnea* (Usneaceae), *Cladonia* (Cladoniaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae). Ademais este composto ocorre na natureza de duas formas enantioméricas (-) e (+), dependendo da projeção angular do grupo metila do carbono quiral na posição 9b (Figura 12). Esta característica confere ao ácido úsnico atividades biológicas e mecanismos de ação que vão depender da forma enantiomérica encontrada (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO et al., 2002; LIRA, 2007).

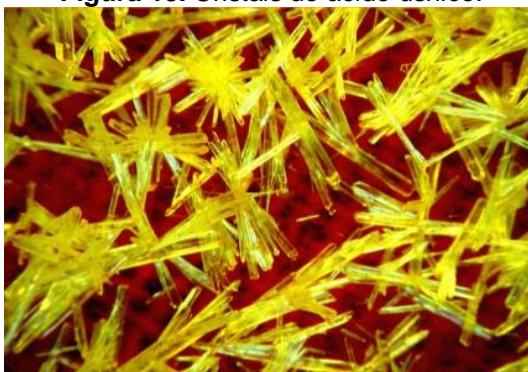
Figura 12. Estrutura química do ácido úsnico e seu enantiômero. a – (+)-(9b-R) e (-)-(9b-S); b – ácido isoúsnico (+)-(9b-R) e (-)-(9b-S).



Fonte: Ingólfssdóttir (2002).

A molécula de ácido úsnico é caracterizada por apresentar baixa solubilidade em água e glicerol, apresentando solubilidade parcial em etanol e muito solúvel em dimetilsulfóxido, acetona, éter quente, benzeno, metanol e clorofórmio. O caráter hidrofóbico desta substância se dá pela presença de quatro grupos cetônicos e do anel furano que une os dois anéis aromáticos existente na estrutura molecular. Seus cristais de coloração amarela (Figura 13) podem variar de forma de acordo com o solvente utilizado na sua recristalização (ASAHINA & SHIBATA, 1954; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Figura 13. Cristais de ácido úsnico.



Fonte: Lima (2004).

Com relação às atividades biológicas do ácido úsnico pode-se destacar sua ação antibiótica, na qual através de estudos realizados por Shibata & Miura, 1948, foi observado que o ácido úsnico isolado de *Ramalina reticulata* conseguiu inibir o crescimento de *Pneumococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Mycobacterium*. Colaborando com esses resultados, Lauterwein et al. (1995) mostrou que os ácidos úsnico e vulpínico são ativos não só contra algumas espécies de bactérias Gram-positivas mas também contra fungos. Esse mesmo estudo demonstrou que estes metabólitos não possuem atividade contra bactérias gram-negativas como, *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*.

Outra atividade importante do ácido úsnico foi investigada por Martins (2014), que a partir deste metabólito extraído de *Cladonia substellata* sintetizou o sal de usnato de potássio, usando-o contra embriões e caramujos de *B. glabrata*. O usnato de potássio em baixas concentrações mostrou ser um efetivo agente moluscicida.

A OMS recomenda que drogas com atividade moluscicida apresentem uma letalidade de 50% (CL 50) e 90% (CL90) de uma população de moluscos com doses expressas em µg/mL, mas estabelecendo critérios de toxicidade ambiental. Então mesmo que determinado composto - incluindo os de origem natural - tenham ação moluscicida é necessário à realização de testes ecotoxicológicos utilizando animais não alvos presentes no ambiente aquático (WHO, 1983; WHO, 1993; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN 2000).

2.5 Testes ecotoxicológicos

A ecotoxicologia tem por princípio estudar os efeitos de substâncias químicas, naturais ou sintéticas, sobre organismos vivos ou ecossistemas, fornecendo

informações relevantes e confiáveis sobre a ação desses produtos. Através de testes ecotoxicológicos é possível avaliar potenciais danos aos seres vivos baseando-se na resposta de um organismo exposto a diferentes concentrações de uma substância por um período determinado. Analisar as alterações bioquímicas e fisiológicas causadas é fundamental neste processo, pois estes parâmetros influenciam nas taxas de nascimento, crescimento e mortalidade dos indivíduos (COSTA et al., 2008; HADER & RICHTER, 2009; WALKER, 2012).

Sendo assim, constituindo-se como uma alternativa viável de avaliação ecotoxicológica, os bioensaios se destacam pela capacidade simples de avaliação e pelo rápido monitoramento das respostas biológicas. Os organismos bioindicadores que podem ser usados nestes bioensaios são algas, microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas (CAVALCANTE et al., 2000; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

2.5.1 Bioensaio com *Artemia salina*

O microcrustáceo marinho *Artemia salina* (Figura 14), também conhecido como camarão de água salgada, é um invertebrado que mede cerca de 8 a 10 mm de comprimento. São considerados consumidores primários ou secundários, sendo um importante elo entre os níveis inferiores e superiores na cadeia alimentar de um ecossistema (SIQUEIRA et al., 1998; ZAGATTO, 2000; DUMITRASCU, 2011).

Figura 14. *Artemia salina*.



Fonte: Zoonar (2014)

Devido ao grande potencial reprodutivo dos organismos adultos podem ser obtidos facilmente no mercado e mantidos em laboratório. Além destas características, sua resistência à manipulação, ciclo de vida curto e adaptação às

fontes nutricionais, o tornam um dos organismos mais utilizados em testes ecotoxicológicos (WEIDEBORG, 1997; NUNES et al., 2006).

O bioensaio com *Artemia salina* se estabelece como um método que garante boa reprodutibilidade, confiabilidade, ótimo custo-benefício e que não requer métodos assépticos (SIQUEIRA et al., 1998; NUNES et al., 2006). Assim, é possível usar esse microcrustáceo como um bioindicador conveniente para avaliar a ecotoxicidade de substâncias naturais e sintéticas com potencial biotecnológico, inclusive em testes para revelar a toxicidade de compostos bioativos com propriedades moluscidas (MEYER et al., 1982; SILVA., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2015; ROCHA-FILHO et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos tóxicos e morfofisiológicos de *Cladonia substellata* sobre *Biomphalaria glabrata* e agente etiológico da esquistossomose mansônica.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar líquens de *Cladonia substellata*;
- Obter o extrato etéreo de *Cladonia substellata*;
- Realizar a análise química do extrato etéreo de *Cladonia substellata*
- Avaliar a toxicidade do extrato etéreo de *Cladonia substellata* sobre embriões (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage) de *B. glabrata*;
- Avaliar a toxicidade do extrato etéreo de *Cladonia substellata* sobre adultos de *B. glabrata*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato etéreo de *Cladonia substellata* sobre hemócitos de caramujos adultos de *B. glabrata*;
- Avaliar a genotoxicidade do extrato etéreo através do ensaio cometa utilizando hemolinfa de adultos *B. glabrata*;
- Avaliar a toxicidade do extrato etéreo sobre cercárias de *S. mansoni*;
- Avaliar a ecotoxicidade ambiental da *Cladonia substellata* sobre o bioindicador *Artemia salina*;

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de *Cladonia substellata*

Amostras de *Cladonia substellata* (Vainio, 1887) foram coletadas em solos arenosos de Cerrado em fevereiro de 2019 na cidade de Mamanguape, Paraíba (Nordeste do Brasil), às margens da Rodovia Federal BR-101, nas coordenadas 6°42'17.7"S 35°7'3.4 " W . O espécime foi depositado no Herbário Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil, exsicata nº 85.216.

4.2 Preparação do extrato etéreo de *Cladonia substellata*

O extrato orgânico foi obtido por sistema de exaustão à temperatura ambiente (28 ± 2 °C) a partir de talos de líquen seco (100 g) com éter etílico (PA 99,5% PA Isofar®, Petrópolis, Brasil). O material foi moído em almofariz e extraído com 100 mL de éter etílico (5x) sob agitação por 2 h, sendo então mantido a 4 °C por 24h. Após esse período, o material foi filtrado em papel filtro (Whatman nº 9) e concentrado à secua em rota-evaporador (Flash Evaporator-115V. BuchlerInstrumentos. Fort Lee. NJ, EUA) acoplado a banho-maria (CT 246 CIENTEC) à temperatura de ebulição do solvente (40 °C) (Araújo et al., 2021b).

4.3 Cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência

Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD), 0,1 mg do extrato etéreo foi dissolvido em éter dietílico (0,5 mL), em seguida, 1 µL da solução foi submetido à cromatografia ascendente em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ (Merck®, Darmstadt, Alemanha) com 10 x 10 cm, sendo desenvolvidas nos sistemas de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v), segundo Culberson (1972). As bandas obtidas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm e visualizadas em placa (Fisatom modelo 509, São Paulo, Brasil), após pulverização de H₂SO₄ a 10%, e aquecida a 50 °C por 30 min. As bandas destacadas foram analisadas por reação de coloração e obtenção de valores de fator de retenção (Rf), sendo posteriormente comparadas com as características dos padrões. Para a determinação dos metabólitos de líquen presentes no extrato etéreo de *C. substellata*, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo a metodologia descrita por Legaz e Vicente (1983), utilizando um

cromatógrafo Hitachi (655 A-11, Tóquio, Japão) acoplado a um detector de UV a 254 nm. Para a separação dos metabólitos, foi utilizada uma coluna C-18 de fase reversa MicroPack MCH-18, 300 x 4 mm, Berlim, Alemanha (Merk® KGaA, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi composta por metanol/água deionizada/ácido acético (80: 19.5: 0.5 v/v/v) em sistema isocrático. Outros parâmetros analíticos foram os seguintes: volume de injeção de 20 mL, atenuação de 0,16, pressão de 87 atm, vazão de 1,0 mL min⁻¹ em temperatura ambiente (28 ± 3 °C). As amostras foram injetadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ diluída em éter dietílico Merk® (Araújo et al., 2019b).

4.4 Bioensaio

4.4.1 Obtenção do *Biomphalaria glabrata*

Caramujos adultos *B. glabrata* foram coletados no Município de São Lourenço da Mata, Pernambuco-Brasil, e mantidos por gerações sucessivas no moluscário da Área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil. Os caramujos são mantidos em tanques plásticos de 20 litros de água filtrada e decolorada, pH 7,0 e temperatura de 25 ± 3° C e alimentados diariamente com *Lactuca sativa* orgânica.

4.4.2 Ensaio de embriotoxicidade de *B. glabrata*

O ensaio de embriotoxicidade foi realizado de acordo com estudos de Araújo et al. (2018). Tiras de polietileno incolores (10x10cm) foram colocadas na superfície da água do aquário para coleta das desovas dos caramujos adultos. As desovas depositadas foram separadas com auxílio de microscópio estereoscópico (Wild M3B, Heerbrugg, Suíça) e analisadas de acordo com Kawano et al. (1992) sobre sua viabilidade e estágio embrionário, identificados em blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage.

O extrato etéreo de *C. substellata* foi solubilizado em 0,5% de DMSO para obtenção da solução mãe e posteriormente diluída em concentrações finais variando de 1,0 - 5,0 µg/ml para os grupos teste. Para cada concentração foram selecionados 100 embriões de cada estágio evolutivo. Foram utilizados dois grupos controles negativos: C1 (embriões expostos apenas à água filtrada decolorada) e C2 (embriões

expostos a 0,5% de DMSO em água filtrada declorada); além de um grupo controle positivo formado por embriões expostos a 1,0 µg/mL de NCL.

Todos os grupos foram expostos durante 24 h. Passado esse tempo os embriões foram lavados com água filtrada declorada, transferidos para placas limpas contendo apenas água filtrada declorada e avaliados com auxílio de um microscópio (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland.) após 7 dias do início do desenvolvimento embrionário (blástula), momento que ocorre a eclosão dos caramujos jovens dos grupos controles negativos. Posteriormente, a viabilidade dos embriões foi classificada em positiva (eclosão) ou negativa (morte ou malformação). Dois experimentos independentes e em triplicata foram realizados para cada estágio embrionário.

4.4.3 Ensaio de toxicidade em *B. glabrata* adultos

O ensaio de toxicidade de *B. glabrata* foi realizado de acordo com o método recomendado pela Organização Mundial da Saúde (1965). Adultos jovens de *B. glabrata* (pigmentados com diâmetro da concha 13 ± 1 mm) foram colocados em recipientes individuais (180 mL de água filtrada declorada) e observados por 7 dias consecutivos para verificação da maturidade sexual. Após esse período, grupos de caramujos com maturidade sexual comprovada ($n = 10$) foram formados e expostos ao extrato etéreo de *C. substellata*, solubilizado em 0,5% de DMSO, nas seguintes concentrações: 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 µg/mL. O experimento foi acompanhado de dois grupos controles negativo, a saber: C1 (caramujos adultos expostos apenas à água filtrada declorada) e C2 (caramujos adultos expostos a 0,5% de DMSO em água filtrada declorada); além do grupo controle positivo de caramujos adultos expostos a 1,0 µg/mL de NCL. Após 24 h de ensaio todos os grupos foram lavados em água filtrada e declorada.

Posteriormente, os moluscos vivos foram transferidos individualmente para recipientes com água filtrada e declorada (180 mL), alimentados com *Lactuca sativa* orgânica e monitorados diariamente por 7 dias. Os critérios de mortalidade foram: retração da massa cefalopodal na concha, perda da hemolinfa, descoloração da cor da concha e/ou ausência de batimentos na cavidade pericárdica. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Para avaliar os efeitos do extrato etéreo de *C. substellata* na fertilidade e fecundidade de *B. glabrata*, foram coletadas desovas dos caramujos que sobreviveram após exposição às concentrações de 1,0 - 3,0 µg/mL do extrato. Após 24 h os embriões foram registrados por 7 dias consecutivos e analisados até eclosão completa controles negativo (C1 - água filtrada declorada; C2 - 0,5% de DMSO em água filtrada). Os embriões foram quantificados e classificados em viáveis (normais) e inviáveis (mortos e malformados).

4.4.4 Avaliação citotóxica sobre hemócitos de *B. glabrata*

Caramujos (n = 20) foram expostos a concentrações subletais do extrato etéreo de *C. substellata* (1,0 - 2,5 µg/mL) por 24 h. Após o tempo de exposição ao extrato, os caramujos foram transferidos para recipientes com água filtrada declorada (pH 7,0) por mais 24 h. O experimento foi acompanhado de dois controles negativos (C1 - água filtrada e declorada; C2 - 0,5% de DMSO em água filtrada e declorada). Dos caramujos que sobreviveram, foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos para coleta de hemolinfa e posterior análise morfológica e quantitativa dos hemócitos.

A análise morfológica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pavlica et al. (2000) e Siqueira et al. (2020). Amostras de 100 µl de hemolinfa foram coletadas e depositadas em lâminas de microscopia onde foram adicionados 100 µl de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) diluído em solução de Ringer a 10 mM. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida por 30/40 min e após esse tempo as células foram fixadas com 200 µl de glutaraldeído em solução de Ringer a 1% (v/v) por 5 min. As lâminas foram lavadas com solução de Ringer e coradas com Giemsa a 5% por 7 min. Hemócitos (n = 1000) foram analisados em quintuplicata com a utilização de microscópio óptico (Leica DM1000), com objetiva de 100x.

4.4.5 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o método descrito por Singh et al. (1988), com modificações. Caramujos expostos ao extrato etéreo de *C. substellata* nas concentrações de 1,0 - 2,5 µL/mL e dos grupos controles negativos (C1 - água filtrada e declorada; C2 - 0,5% de DMSO em água filtrada e declorada) tiveram cada um, 100 µL de hemolinfa coletada e homogeneizada em agarose de baixo ponto de fusão (1:1). Imediatamente, o homogenato foi colocado em lâminas

de microscopia previamente cobertas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) dissolvida em PBS (pH 7,4), cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 10 min. Após a solidificação as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton-X 100 e 10% DMSO, pH 10,0) por 12 h a 4°C. Com a lise realizada as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo uma solução tampão alcalina, pH 13,0 (1 mM EDTA e 300 mM NaOH), por 20 min. Subsequentemente, a eletroforese foi iniciada por 20 min a 4°C em 0,74 V/cm e 300 mA. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) por 15 min, fixadas com álcool absoluto por 10 min, secas em temperatura ambiente e armazenadas a 4°C para posterior análise.

4.4.5.1 Análise de microscopia de fluorescência

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) com os seguintes parâmetros: ampliação de 400x, filtro de excitação: 450-490 nm, filtro de emissão: 500-550 nm e filtro barreira: 495 nm. Para coloração das lâminas foi utilizada uma solução segura SYBR (Invitrogen) (50µL; 1:500) e o dano ao DNA dos hemócitos foi avaliado visualmente de acordo com os parâmetros estabelecidos por Collins et al. (2008). Cem nucleoides foram contados para cada réplica, totalizando 400 nucleoides, que foram classificados em 5 categorias de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4), dependendo da extensão do dano. A categoria 0 indica que não ocorreu nenhum dano, enquanto as categorias 1 a 4 indicam níveis crescentes de dano ao material genético. Para avaliar o grau de dano ao DNA, o Índice de Danos (ID) e a Frequência de Danos (FD%) foram utilizados como parâmetros. O ID foi calculado de acordo com a fórmula: ID = 0 (número de cometas categoria 0) + 1 (número de cometas categoria 1) + 2 (número de cometas categoria 2) + 3 (número de cometas categoria 3) + 4 (número de cometas categoria 4) de cometas categoria 4). O FD% foi calculado como o valor percentual de todos os cometas com danos no DNA (categoria 1 - 4) em relação ao número total de cometas (categorias 0 - 4), de acordo com a fórmula:

$$FD\% = \frac{[(Total\ number\ of\ comets - N^\circ\ of\ category\ 0\ comets)100]}{Total\ number\ of\ comets}$$

4.4.6 Ensaio de toxicidade com cercárias de *S.mansoni*

Cercárias de *S. mansoni* (Cepa-BH) foram obtidas de adultos de *B. glabrata* (n = 30) previamente infectados em laboratório com miracídios (n = 6). Após 35 dias de infecção dos caramujos, a liberação das cercárias foi realizada através da exposição destes caramujos, submersos em 100 mL de água filtrada e decolorada, à luz artificial (60W) por 2h, como descrito em trabalho anterior de Silva et al. (2018). A estimativa de cercárias foi calculada com auxílio de estereomicroscópio (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland) e uma alíquota de 100 cercárias/mL foi transferida para um recipiente de vidro côncavo (vidro relógio) e exposta ao extrato etéreo de *Cladonia substellata*, solubilizado em 0,5% de DMSO, para concentrações finais de 10, 7,5, 5,0, 2,5 e 1,0 µg/mL. O experimento foi acompanhado de dois grupos controles negativo, a saber: C1 (cercárias expostas apenas a água filtrada decolorada) e C2 (cercárias expostas a 0,5% de DMSO em água filtrada decolorada); além do grupo controle positivo de cercárias expostas a 1,0 µg/mL de NCL.

As cercárias foram avaliadas imediatamente após contato com o extrato etéreo de *C. substellata* (tempo 0h) e após 15, 30, 60, 90 e 120 min de exposição. Os seguintes parâmetros foram usados para a avaliação cercaricida: letalidade de 100% das cercárias (+++); letalidade de mais de 50% das cercárias (++); letalidade de menos de 50% das cercárias (+) e ausência de letalidade (-). O bioensaio foi realizado em triplicata.

4.4.7 Ecotoxicidade ambiental em *Artemia salina*

O ensaio de ecotoxicidade foi empregado de acordo com Meyer et al. (1982). Ovos encistados de *A. salina* foram colocados em béquer (1L) contendo 500 mL de água do mar (pH 8,0) em aeração constante a 25°C ± 2 por 48 h. Após a eclosão, as larvas foram separadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland) para formar grupos experimentais com 10 larvas cada. *A. salina* foi exposta ao extrato etéreo de *C. substellata*, solubilizado em 0,5% de DMSO, em diferentes concentrações (1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 µg/mL) durante 24 h a 25°C ± 2. Os grupos controles negativos (C1 - água do mar e C2 - 0,5% de DMSO em água do mar) e controle positivo (1,0 µg/mL de NCL) foram submetidos às mesmas condições experimentais. Dois experimentos independentes

foram realizados em duplicata e a mortalidade e sobrevivência das larvas avaliadas com auxílio de estereomicroscópio.

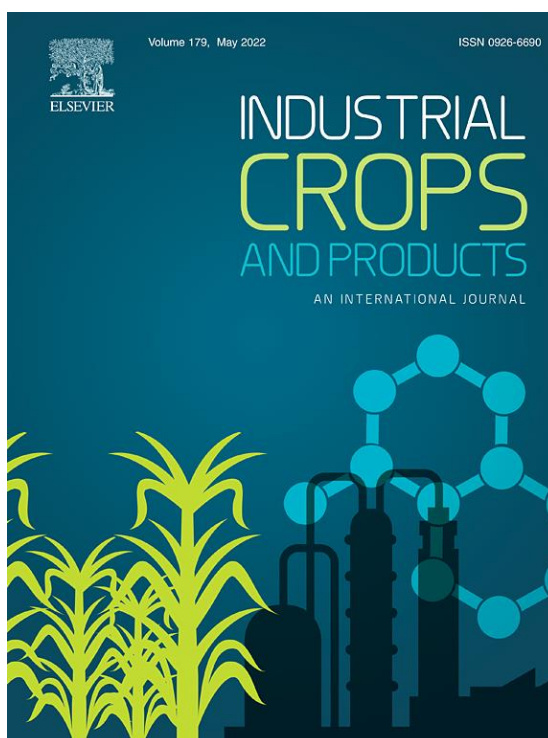
4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5.0* (San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo pós teste de Newman - Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As concentrações letais necessárias para matar 10% (CL₁₀), 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de *B. glabrata* (embriões e adultos) e *Artemia salina* foram calculadas pelo método probit por meio do programa *StatPlus®* 2009 (*AnalystSoft*, Canadá).

5. RESULTADOS

ARTIGO - *Cladonia substellata* (Lichen): Toxicological, cytotoxic and genotoxic effects on the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO



INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

Editores-chefes: D.S. Bajwa, PhD; E. Johansson, PhD; O. Koul, PhD; R.C. Sun, PhD

Fator de impacto: 5.645

Copyright © 2022 Elsevier B.V. All rights reserved

ISSN: 0926-6690

Qualis capes: A1

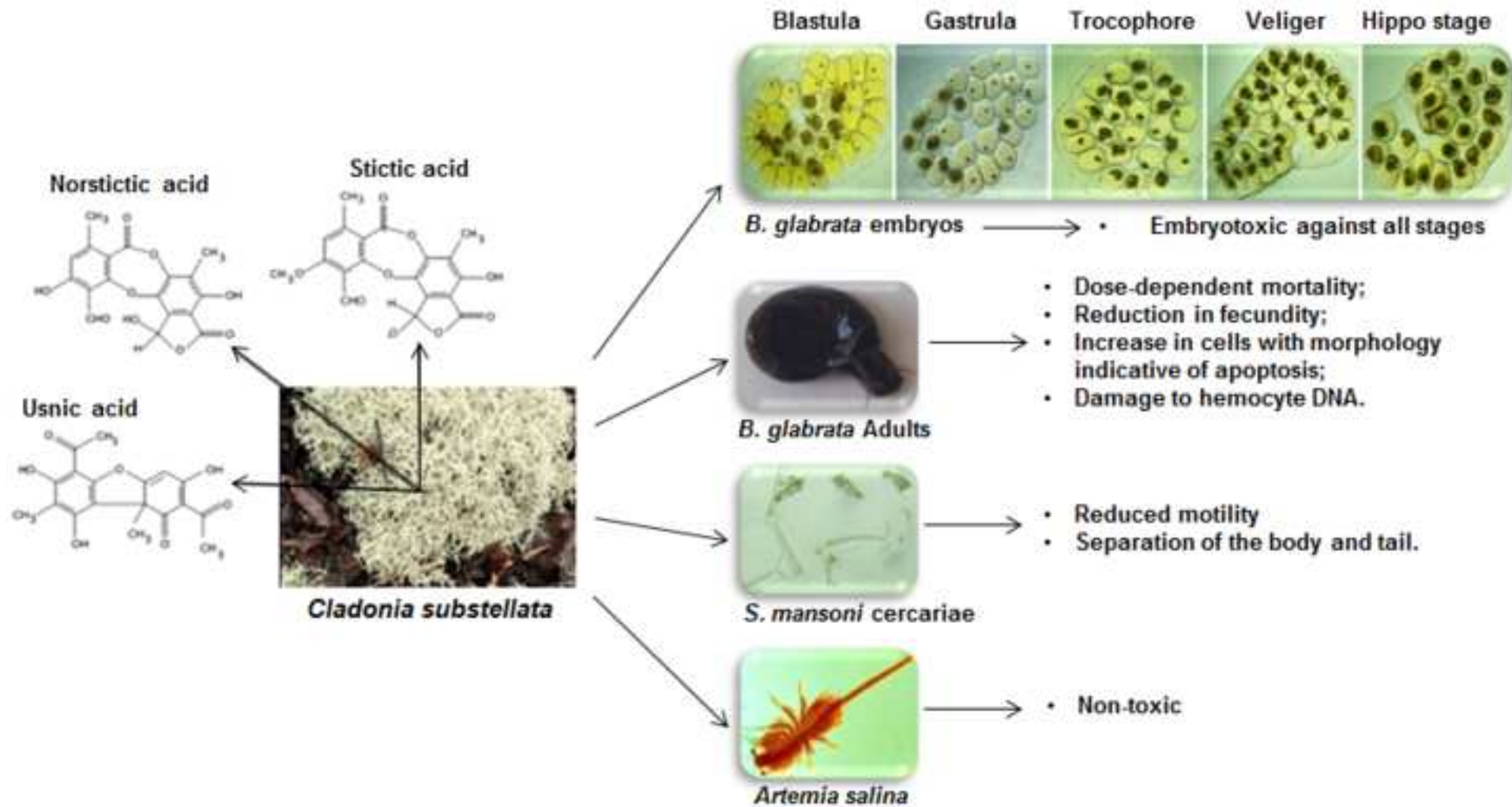
Carta de submissão em anexo 1.

Industrial Crops & Products

Cladonia substellata (Lichen): Toxicological, cytotoxic and genotoxic effects on the developmental stages of Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni cercariae --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Non-food bioactive products
Keywords:	Cladonia substellata; Biomphalaria glabrata; Molluscicidal; Embryotoxicity; Fecundity and Fertility; Hemocytes
Corresponding Author:	André de Lima Aires Universidade Federal de Pernambuco Recife, BRAZIL
First Author:	João Victor Ritinto da Rocha, M.Sc
Order of Authors:	João Victor Ritinto da Rocha, M.Sc Thierry Wesley de Aguiar Albuquerque, M.Sc Dewson Rocha Pereira, Ph.D Nicácio Henrique da Silva, Ph.D Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, Ph.D Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, Ph.D Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Ph.D Hianna Arely Milca Fagundes Silva, Ph.D Hallysson Douglas Andrade de Araújo, Ph.D André de Lima Aires, Ph.D
Abstract:	<p>We aimed to evaluate the molluscicidal and antiparasitic activities of the ethereal extract of the lichen <i>Cladonia substellata</i> against embryos and adults from <i>Biomphalaria glabrata</i> and cercariae of <i>Schistosoma mansoni</i>. Toxicity parameters were evaluated at sublethal doses of the ethereal extract of <i>C. substellata</i> on the fertility/fecundity of adult snails, as well as genotoxic damage and morphological changes in hemocytes. The bioindicator <i>Artemia salina</i> was used for the environmental toxicity test. Chromatographic analysis of the ethereal extract of <i>C. substellata</i> revealed the presence of stictic (4.12%), norstictic (2.14%) and usnic (92.58%) acids. Ethereal extract of <i>C. substellata</i> showed toxicity against all embryonic stages with LC₅₀ of 1.59, 2.47, 3.39, 2.36 and 0.92 µg/mL for blastula, gastrula, trocophore, veliger and hippo stage, respectively. The LC₅₀ for <i>B. glabrata</i> adults was 2.11 µg/mL and the extract altered the fecundity pattern, reducing the number of embryos/snail. The extract increased the number of cells with morphology indicative of apoptosis and the frequency and rate of DNA damage in hemocytes. Reduction in motility of cercariae exposed to the ethereal extract of <i>C. substellata</i> was observed from 2.5 µg/mL after 15 min and 100% mortality is reached at 5.0 µg/mL after 120 min. On <i>A. salina</i>, the ethereal extract of <i>C. substellata</i> was non-toxic at the concentrations evaluated (1.0 - 5.0 µg/mL). The ethereal extract of <i>C. substellata</i> is a promising molluscicide for population control of embryos and adults of <i>B. glabrata</i>, the intermediate host of <i>S. mansoni</i>. The extract caused hemocytic and genotoxic damage in adult snails, showed action against cercariae, an infective phase for the definitive host, man, and was not toxic to the environmental bioindicator.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Therese D. Brackenbury brackent@biology.und.ac.za</p> <p>Ronaldo G. C Scholte ronaldo.scholte@unibas.ch</p> <p>John B. Malone</p>

	malone@vetmed.lsu.edu
	Samar N. El-Beshbishi selbeshbishi@yahoo.com
	Wei Wang wangwei@jipd.com



1 ***Cladonia substellata* (Líquén): Efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos sobre**
2 **os estágios de desenvolvimento do *Biomphalaria glabrata* e cercárias de**
3 ***Schistosoma mansoni***

4

5 João Victor Ritinto da Rocha^{a,b}, Thierry Wesley de Aguiar Albuquerque^c, Dewson
6 Rocha Pereira^d, Nicácio Henrique da Silva^c, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo
7 Albuquerque^{b,e}, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo^d, Luana Cassandra
8 Breitenbach Barroso Coelho^c, Hianna Arely Milca Fagundes Silva^d, Hallysson
9 Douglas Andrade de Araújo^{b,c}, André de Lima Aires ^{a,b,e*}

10 ^a Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia,
11 Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
12 Universitária, Recife 50670-501, PE, Brazil.

13 ^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de
14 Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife, 50670-
15 501, PE, Brazil.

16 ^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
17 Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE,
18 Brazil.

19 ^d Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco,
20 Avenida Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-501, PE,
21 Brazil.

22 ^e Centro de Ciências Médicas – Área Acadêmica de Medicina Tropical, Universidade
23 Federal de Pernambuco, Recife 50670-501, PE, Brazil.

24 **Resumo:**

25 Objetivamos avaliar as atividades moluscicida e antiparasitária do extrato etéreo do
26 líquen *Cladonia substellata* contra embriões e adultos *Biomphalaria glabrata* e
27 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Parâmetros de toxicidade foram avaliados em
28 doses subletais do extrato etéreo de *C. substellata* sobre a fertilidade/fecundidade
29 de caramujos adultos, bem como os danos genotóxicos e alterações morfológicas
30 nos hemócitos. Para o ensaio de toxicidade ambiental foi utilizado o bioindicador
31 *Artemia salina*. As análises cromatográficas do extrato etéreo de *Cladonia*
32 *substellata* revelaram a presença dos ácidos estítico (4,12%), nortítico (2,14%) e
33 úsnico (92,58%). Extrato etéreo de *C. substellata* apresentou toxicidade contra todos
34 os estádios embrionários com LC₅₀ de 1,59, 2,47, 3,39, 2,36 e 0,92 µg/mL para
35 blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage, respectivamente. A LC₅₀ para
36 adultos *B. glabrata* foi de 2,11 µg/mL e o extrato alterou o padrão de fecundidade,
37 reduzindo o número de embriões/caramujo. O extrato aumentou o número de células
38 com morfologia indicativa de apoptose e a frequência e índice de danos ao DNA de
39 hemócitos. Redução na motilidade de cercárias expostas ao extrato etéreo de *C.*
40 *substellata* foi observada a partir de 2,5 µg/mL após 15 min e mortalidade de 100% é
41 alcançada em 5,0 µg/mL após 120 min. Sobre *A. salina* o extrato etéreo de *C.*
42 *substellata* foi atóxico nas concentrações avaliadas (1,0 - 5,0 µg/mL). O extrato
43 etéreo de *C. substellata* é um promissor moluscicida no controle populacional de
44 embriões e adultos *B. glabrata*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. O extrato
45 causou danos hemocitários e genotóxicos em caramujos adultos, apresentou ação
46 contra cercárias, fase infectante para o hospedeiro definitivo, o homem, e foi atóxica
47 contra *A. salina*.

49 Palavras-chave: *Cladonia substellata*, *Biomphalaria glabrata*, Moluscicida,
50 Embriotoxicidade, Fecundidade e Fertilidade, Hemócitos.

51

52 **1 Introdução**

53 Os líquens são organismos simbióticos resultantes da associação entre um ou
54 mais fotobiontes (microalga verde ou cianobactéria para captação de CO₂ e, no caso
55 dos cianolíquens, fixação de N₂) e um micobionte (parceiro fúngico, componente
56 formador da estrutura do líquen) (Garty, 2001; Zhao et al., 2020). Esta simbiose é
57 responsável pela produção de diversos metabólitos secundários naturais, sendo
58 identificados até o momento, mais de 1000 compostos produzidos por líquens, dos
59 quais, em média 80% das moléculas são exclusivas desta associação (Olivier-
60 Jimenez et al., 2019; Goodenough e Roth, 2021). Pesquisas recentes destacam o
61 interesse da comunidade científica e da indústria farmacêutica sobre a diversidade
62 estrutural e funcional dessas moléculas bioativas como promissores agentes
63 terapêuticos. Este cenário pode ser comprovado através de estudos que reportam
64 as atividades anti-inflamatória (Hong et al., 2021), antimicrobiana (Karabacak et al.,
65 2014), anticarcinogênica (Russo et al., 2012), antinociceptiva (Araújo et al., 2019),
66 antioxidante (Fernández-Moriano et al., 2016), antiparasitária (Luz et al., 2015) e
67 moluscicida (Martins et al., 2014; Araújo et al., 2018a,b; Silva et al., 2019). Além
68 destas atividades, líquens e seus metabólitos têm sido explorados no controle de
69 pragas e de vetores biológicos de agentes etiológicos com importância na medicina
70 humana e veterinária (Bomfim et al., 2009; Yildirim et al., 2012a; Emsen et al., 2015;
71 Moura et al., 2017; Martins et al., 2017; Silva et al., 2018; 2019; 2021a; 2021b;
72 Araújo et al., 2021a,b; Muhoro; Farkas, 2021).

73 Dentre as diversas espécies de líquens, *Cladonia substellata* (Vainio, 1887)
74 tem se destacado devido aos compostos fenólicos que podem ser isolados, como os
75 ácidos úsnico, estíptico, constíptico, hipostíptico, criptostíptico, nortíptico e connostíptico
76 (Ahti, 2000; Santiago et al., 2018). Estudos que reportam atividade fungicida e
77 bactericida do extrato etéreo de *C. substellata* concluem que essas atividades
78 devem-se ao efeito sinérgico entre seus metabólitos (Ribeiro et al., 2006; Santiago et
79 al., 2018). O ácido úsnico, um dos principais compostos fenólicos e metabólito
80 comum no gênero de líquens *Cladonia*, apresentou ação larvicida contra *Culex*
81 *pipiens* L. (Cetin et al., 2008), efeito embriotóxico, retardando o crescimento e
82 desenvolvimento em coleóptero *Xyleborus fornicates* (Sahib et al., 2008) e efeito
83 teratogênico ao reduzir o ganho de peso durante a gestação e redução do número
84 de fetos viáveis em ratas (Silva et al., 2017).

85 Com relação ao controle populacional de caramujos vetores (hospedeiro
86 intermediário) e do agente infeccioso do parasita *Schistosoma mansoni* (cercárias),
87 extratos e compostos liquênicos têm apresentado resultados promissores. Em
88 concentrações que apresentaram atividade moluscicida mostraram toxicidade
89 ambiental tolerável ou foram atóxicos. Ausência de citotoxicidade em células
90 mononucleares de sangue periférico de humanos também pôde ser vista em alguns
91 trabalhos (Martins et al., 2017; Silva et al., 2019; 2020; 2021a; Araújo et al., 2019a;
92 2021a,b). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda três medidas
93 principais para interromper a transmissão do *Schistosoma* spp: (1) tratamento
94 periódico e em larga escala com praziquantel (PZQ), único medicamento disponível;
95 (2) garantia do acesso à água potável e ao saneamento básico; e o (3) controle
96 populacional dos caramujos vetores (WHO, 2022). No entanto, com o aumento do
97 número de casos de esquistossomose em áreas endêmicas ao longo dos anos, é

98 possível alertar que o tratamento periódico e em larga escala com PZQ e a ausência
99 ou escassez de investimentos em saneamento básico torna o controle populacional
100 de caramujos vetores um estratégia prioritária para reduzir a infecção por
101 *Schistosoma* spp (Moloo, 2020).

102 A Niclosamida (NCL) (Bayluscide®) é o único moluscicida, sintético
103 recomendado pela OMS como uma das estratégias de combate à esquistossomose
104 (WHO, 2017). Apesar da sua eficácia, NCL possui alto custo de aplicação,
105 instabilidade sob luz solar, bioacumulação, alta toxicidade para organismos não
106 alvos (flora e fauna), causa irritabilidade na pele e mucosa de humanos, além de
107 existirem relatos de resistência e/ou tolerância em cepas de caramujos (Oliveira-
108 Filho; Paumgarten, 2000; Chen et al., 2012, Coelho; Caldeira, 2016).
109 Recentemente, o programa Global Vector Control Response 2017–2030 (GVCR) da
110 OMS reforçou sua mensagem para moluscicidas mais seguros como parte das
111 estratégias necessárias para fortalecer o controle de vetores em todo mundo (WHO,
112 2017).

113 Aqui, exploramos pela primeira vez a toxicidade do extrato etéreo de *C.*
114 *substellata* sobre embriões (estágio de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo
115 stage) e adultos *B. glabrata*, seu efeito citotóxico e genotóxico sobre hemócitos,
116 atividade sobre cercárias de *S. mansoni* e avaliação ecotoxicológica sobre o
117 bioindicador *Artemia salina*. Este estudo ampliará o escopo de aplicação do extrato
118 etéreo de *C. substellata* e fornecerá uma nova alternativa no controle populacional
119 de caramujos vetores da esquistossomose mansônica.

120

121 **2 Metodologia**

122 2.1 Coleta de *Cladonia substellata*

123 Amostras de *C. substellata* (Vainio, 1887) foram coletadas em solos arenosos
124 de Cerrado em fevereiro de 2019 na cidade de Mamanguape, Paraíba (Nordeste do
125 Brasil), às margens da Rodovia Federal BR-101, nas coordenadas 6°42'17.7"S
126 35°07'3.4 " W. O espécime foi depositado no Herbário Geraldo Mariz do
127 Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE,
128 Brasil, exsicata nº 85.216.

129 2.2 Preparação do extrato etéreo de *Cladonia substellata*

130 O extrato orgânico foi obtido por sistema de exaustão à temperatura ambiente
131 (28 ± 2 °C) a partir de talos de líquen seco (100 g) com éter etílico (PA 99,5% PA
132 Isofar®, Petrópolis, Brasil). O material foi moído em almofariz e extraído com 100
133 mL de éter etílico (5x) sob agitação por 2 h, sendo então mantido a 4 °C por 24h.
134 Após esse período, o material foi filtrado em papel filtro (Whatman nº 9) e
135 concentrado à secua em rota-evaporador (Flash Evaporator-115V.
136 BuchlerInstrumentos. Fort Lee. NJ, EUA) acoplado a banho-maria (CT 246
137 CIENTEC) à temperatura de ebulição do solvente (40 °C) (Araújo et al., 2021b).

138 2.3 Cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência

139 Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD), 0,1 mg do extrato
140 etéreo foi dissolvido em éter dietílico (0,5 mL), em seguida, 1 µL da solução foi
141 submetido à cromatografia ascendente em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ (Merck®,
142 Darmstadt, Alemanha) com 10 x 10 cm, sendo desenvolvidas nos sistemas de
143 solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v), segundo Culberson
144 (1972). As bandas obtidas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e
145 366 nm e visualizadas em placa (Fisatom modelo 509, São Paulo, Brasil), após

146 pulverização de H₂SO₄ a 10%, e aquecida a 50 °C por 30 min. As bandas
147 destacadas foram analisadas por reação de coloração e obtenção de valores de
148 fator de retenção (Rf), sendo posteriormente comparadas com as características dos
149 padrões. Para a determinação dos metabólitos de líquen presentes no extrato etéreo
150 de *C. substellata*, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),
151 seguindo a metodologia descrita por Legaz e Vicente (1983), utilizando um
152 cromatógrafo Hitachi (655 A-11, Tóquio, Japão) acoplado a um detector de UV a 254
153 nm. Para a separação dos metabólitos, foi utilizada uma coluna C-18 de fase reversa
154 MicroPack MCH-18, 300 x 4 mm, Berlim, Alemanha (Merk® KGaA, Darmstadt,
155 Alemanha). A fase móvel foi composta por metanol/água deionizada/ácido acético
156 (80: 19.5: 0.5 v/v/v) em sistema isocrático. Outros parâmetros analíticos foram os
157 seguintes: volume de injeção de 20 mL, atenuação de 0,16, pressão de 87 atm,
158 vazão de 1,0 mL min⁻¹ em temperatura ambiente (28 ± 3 °C). As amostras foram
159 injetadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ diluída em éter dietílico (Merk® KGaA,
160 Darmstadt, Germany) (Araújo et al., 2019b).

161 2.4 Bioensaios

162 2.4.1 Obtenção do *B. glabrata*

163 Caramujos adultos *B. glabrata* foram coletados no Município de São Lourenço
164 da Mata, Pernambuco-Brasil, e mantidos por gerações sucessivas no moluscário da
165 Área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da
166 Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil. Os caramujos são
167 mantidos em tanques plásticos de 20 litros de água filtrada e declorada, pH 7,0 e
168 temperatura de 25 ± 3° C e alimentados diariamente com *Lactuca sativa* orgânica.

169 2.4.2 Ensaio de embriotoxicidade de *B. glabrata*

170 O ensaio de embriotoxicidade foi realizado de acordo com estudos de Araújo
171 et al. (2018). Tiras de polietileno incolores (10x10cm) foram colocadas na superfície
172 da água do aquário para coleta das desovas dos caramujos adultos. As desovas
173 depositadas foram separadas com auxílio de microscópio estereoscópico (Wild M3B,
174 Heerbrugg, Suíça) e analisadas de acordo com Kawano et al. (1992) sobre sua
175 viabilidade e estágio embrionário, identificados em blástula, gástrula, trocófora,
176 véliger e hippo stage.

177 O extrato etéreo de *C. substellata* foi solubilizado em 0,5% de DMSO para
178 obtenção da solução mãe e posteriormente diluída em concentrações finais variando
179 de 1,0 - 5,0 µg/ml. Para cada concentração foram selecionados 100 embriões de
180 cada estágio evolutivo. Foram utilizados dois grupos controles negativos: C1
181 (embriões expostos apenas à água filtrada declorada) e C2 (embriões expostos a
182 0,5% de DMSO em água filtrada declorada); além de um grupo controle positivo
183 formado por embriões expostos a 1,0 µg/mL de NCL.

184 Todos os grupos foram expostos durante 24 h. Passado esse tempo os
185 embriões foram lavados com água filtrada declorada, transferidos para placas limpas
186 contendo apenas água filtrada declorada e avaliados com auxílio de um microscópio
187 (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland.) após 7 dias do início do desenvolvimento
188 embrionário (blástula), momento que ocorre a eclosão dos caramujos jovens dos
189 grupos controles negativos. Posteriormente, a viabilidade dos embriões foi
190 classificada em positiva (eclosão) ou negativa (morte ou malformação). Dois
191 experimentos independentes e em triplicata foram realizados para cada estágio
192 embrionário.

193 2.4.3 Ensaio de toxicidade em *B. glabrata* adultos

194 O ensaio de toxicidade de *B. glabrata* foi realizado de acordo com o método
195 recomendado pela Organização Mundial da Saúde (1965). Adultos jovens de *B.*
196 *glabrata* (pigmentados com diâmetro da concha 13 ± 1 mm) foram colocados em
197 recipientes individuais (180 mL de água filtrada decolorada) e observados por 7 dias
198 consecutivos para verificação da maturidade sexual. Após esse período, grupos de
199 caramujos com maturidade sexual comprovada ($n = 10$) foram formados e expostos
200 ao extrato etéreo de *C. substellata*, solubilizado em 0.5% de DMSO, nas seguintes
201 concentrações: 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 $\mu\text{g/mL}$. O experimento foi acompanhado de
202 dois grupos controles negativo, a saber: C1 (caramujos adultos expostos apenas à
203 água filtrada decolorada) e C2 (caramujos adultos expostos a 0,5% de DMSO em
204 água filtrada decolorada); além do grupo controle positivo de caramujos adultos
205 expostos a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de NCL. Após 24 h de ensaio todos os grupos foram lavados
206 em água filtrada e decolorada.

207 Posteriormente, os moluscos vivos foram transferidos individualmente para
208 recipientes com água filtrada e decolorada (180 mL), alimentados com *Lactuca sativa*
209 orgânica e monitorados diariamente por 7 dias. Os critérios de mortalidade foram:
210 retração da massa cefalopodal na concha, perda da hemolinfa, descoloração da cor
211 da concha e/ou ausência de batimentos na cavidade pericárdica. Dois experimentos
212 independentes foram realizados em triplicata.

213 Para avaliar os efeitos do extrato etéreo de *C. substellata* na fertilidade e
214 fecundidade de *B. glabrata*, foram coletadas desovas dos caramujos que
215 sobreviveram após exposição às concentrações de 1,0 - 3,0 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Após
216 24 h os embriões foram registrados por 7 dias consecutivos e analisados até eclosão
217 completa controles negativo (C1 - água filtrada decolorada; C2 - 0,5% de DMSO em

218 água filtrada). Os embriões foram quantificados e classificados em viáveis (normais)
219 e inviáveis (mortos e malformados).

220 2.4.4 Avaliação citotóxica sobre hemócitos de *B. glabrata*

221 Caramujos (n = 20) foram expostos a concentrações subletais do extrato
222 etéreo de *C. substellata* (1,0 - 2,5 µg/mL) por 24 h. Após o tempo de exposição ao
223 extrato, os caramujos foram transferidos para recipientes com água filtrada
224 declorada (pH 7.0) por mais 24 h. O experimento foi acompanhado de dois controles
225 negativos (C1 - água filtrada e declorada; C2 - 0,5% de DMSO em água filtrada e
226 declorada). Dos caramujos que sobreviveram, foram selecionados aleatoriamente 5
227 indivíduos para coleta de hemolinfa e posterior análise morfológica e quantitativa dos
228 hemócitos.

229 A análise morfológica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por
230 Pavlica et al. (2000) e Siqueira et al. (2020). Amostras de 100 µl de hemolinfa foram
231 coletadas e depositadas em lâminas de microscopia onde foram adicionados 100 µl
232 de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) diluído em solução de Ringer a 10 mM.
233 As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida por 30/40 min e após esse
234 tempo as células foram fixadas com 200 µl de glutaraldeído em solução de Ringer a
235 1% (v/v) por 5 min. As lâminas foram lavadas com solução de Ringer e coradas com
236 Giemsa a 5% por 7 min. Hemócitos (n = 1000) foram analisados em quintuplicata
237 com a utilização de microscópio óptico (Leica DM1000), com objetiva de 100x.

238 2.4.5 Ensaio cometa

239 O ensaio cometa foi realizado de acordo com o método descrito por Singh et
240 al. (1988), com modificações. Caramujos expostos ao extrato etéreo de *C.*
241 *substellata* nas concentrações de 1,0 - 2,5 µL/mL e dos grupos controles negativos

242 (C1 - água filtrada e dechlorada; C2 - 0,5% de DMSO em água filtrada e dechlorada)
243 tiveram cada um, 100 µL de hemolinfa coletada e homogeneizada em agarose de
244 baixo ponto de fusão (1:1). Imediatamente, o homogenato foi colocado em lâminas
245 de microscopia previamente cobertas com uma camada de agarose de ponto de
246 fusão normal (1,5%) dissolvida em PBS (pH 7,4), cobertas com lamínulas e mantidas
247 a 4°C por 10 min. Após a solidificação as lamínulas foram removidas e as lâminas
248 incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton-X
249 100 e 10% DMSO, pH 10,0) por 12 h a 4°C. Com a lise realizada as lâminas foram
250 colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo uma solução tampão
251 alcalina, pH 13,0 (1 mM EDTA e 300 mM NaOH), por 20 min. Subsequentemente, a
252 eletroforese foi iniciada por 20 min a 4°C em 0,74 V/cm e 300 mA. Ao final, as
253 lâminas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) por 15 min, fixadas
254 com álcool absoluto por 10 min, secas em temperatura ambiente e armazenadas a
255 4°C para posterior análise.

256 2.4.5.1 Análise de microscopia de fluorescência

257 As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon H550L)
258 com os seguintes parâmetros: ampliação de 400x, filtro de excitação: 450-490 nm,
259 filtro de emissão: 500-550 nm e filtro barreira: 495 nm. Para coloração das lâminas
260 foi utilizada uma solução segura SYBR (Invitrogen) (50µL; 1:500) e o dano ao DNA
261 dos hemócitos foi avaliado visualmente de acordo com os parâmetros estabelecidos
262 por Collins et al. (2008). Cem nucleoides foram contados para cada réplica,
263 totalizando 400 nucleoides, que foram classificados em 5 categorias de dano ao
264 DNA (0, 1, 2, 3 e 4), dependendo da extensão do dano. A categoria 0 indica que não
265 ocorreu nenhum dano, enquanto as categorias 1 a 4 indicam níveis crescentes de
266 dano ao material genético. Para avaliar o grau de dano ao DNA, o Índice de Danos

267 (ID) e a Frequência de Danos (FD%) foram utilizados como parâmetros. O ID foi
268 calculado de acordo com a fórmula: ID = 0 (número de cometas categoria 0) + 1
269 (número de cometas categoria 1) + 2 (número de cometas categoria 2) + 3 (número
270 de cometas categoria 3) + 4 (número de cometas categoria 4) de cometas categoria
271 4). O FD% foi calculado como o valor percentual de todos os cometas com danos no
272 DNA (categoria 1 - 4) em relação ao número total de cometas (categorias 0 - 4), de
273 acordo com a fórmula:

$$274 \quad FD\% = \frac{[(Total\ number\ of\ comets - N^\circ\ of\ category\ 0\ comets)100]}{Total\ number\ of\ comets}$$

275 2.4.6 Ensaio de toxicidade com cercárias de *S.mansoni*

276 Cercárias de *S. mansoni* (Cepa-BH) foram obtidas de adultos de *B. glabrata*
277 (n = 30) previamente infectados em laboratório com miracídios (n = 6). Após 35 dias
278 de infecção dos caramujos, a liberação das cercárias foi realizada através da
279 exposição destes caramujos, submersos em 100 mL de água filtrada e declorada, à
280 luz artificial (60W) por 2h, como descrito em trabalho anterior de Silva et al. (2018). A
281 estimativa de cercárias foi calculada com auxílio de estereomicroscópio (Wild M3B,
282 Heerbrugg, Switzerland) e uma alíquota de 100 cercárias/mL foi transferida para um
283 recipiente de vidro côncavo (vidro relógio) e exposta ao extrato etéreo de *C.*
284 *substellata*, solubilizado em 0,5% de DMSO, para concentrações finais de 10, 7,5,
285 5,0, 2,5 e 1,0 µg/mL. O experimento foi acompanhado de dois grupos controles
286 negativo, a saber: C1 (cercárias expostas apenas a água filtrada declorada) e C2
287 (cercárias expostas a 0,5% de DMSO em água filtrada declorada); além do grupo
288 controle positivo de cercárias expostas a 1,0 µg/mL de NCL.

289 As cercárias foram avaliadas imediatamente após contato com o extrato
290 etéreo de *C. substellata* (tempo 0h) e após 15, 30, 60, 90 e 120 min de exposição.
291 Os seguintes parâmetros foram usados para a avaliação cercaricida: letalidade de
292 100% das cercárias (+++); letalidade de mais de 50% das cercárias (++); letalidade
293 de menos de 50% das cercárias (+) e ausência de letalidade (-). O bioensaio foi
294 realizado em triplicata.

295 2.4.7 Ecotoxicidade em *Artemia salina*

296 O ensaio de ecotoxicidade foi empregado de acordo com Meyer et al. (1982).
297 Ovos encistados de *A. salina* foram colocados em béquer (1L) contendo 500 mL de
298 água do mar (pH 8,0) em aeração constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 48 h. Após a eclosão, as
299 larvas foram separadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Wild M3B,
300 Heerbrugg, Switzerland) para formar grupos experimentais com 10 larvas cada. *A.*
301 *salina* foi exposta ao extrato étereo de *C. substellata*, solubilizado em 0,5% de
302 DMSO, em diferentes concentrações (1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0
303 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Os grupos controles negativos (C1 - água do mar e
304 C2 - 0,5% de DMSO em água do mar) e controle positivo (1,0 $\mu\text{g/mL}$ de NCL) foram
305 submetidos às mesmas condições experimentais. Dois experimentos independentes
306 foram realizados em duplicata e a mortalidade e sobrevivência das larvas avaliadas
307 com auxílio de estereomicroscópio.

308 2.5 Análises estatísticas

309 As análises estatísticas foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5.0* (San
310 Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância
311 unilateral (ANOVA) seguida pelo pós teste de Newman - Keuls. Valores de $p < 0,05$
312 foram considerados significativos. As concentrações letais necessárias para matar

313 10% (CL₁₀), 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de *B. glabrata* (embriões e adultos) e *Artemia*
314 *salina* foram calculadas pelo método probit por meio do programa *StatPlus*[®] 2009
315 (*AnalystSoft*, Canadá).

316 **3 Resultados**

317 3.1 Análise química do extrato etéreo de *C. substellata*

318 A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença
319 dos ácidos estético, nortístico e úsnico no extrato etéreo de *C. substellata* com fator
320 de retenção (Rf) de 0,51, 0,61 e 0,84 respectivamente, semelhantes aos padrões
321 destes ácidos. Os dados da CCD foram confirmados nas análises por cromatografia
322 líquida de alta eficiência (CLAE). A presença do ácido úsnico como o principal
323 composto fenólico neste extrato com tempo de retenção (RT) de 17,69 min chegou a
324 92,58%. Enquanto os demais ácidos, o estético e norstictic apresentaram RT de 3,19
325 e 4,60 com percentuais de 4,12% e 2,14% respectivamente. Ademais, 0,34%
326 corresponderam ao solvente e um pico não identificado com percentual irrisório.

327 3.2 O extrato etéreo de *C. substellata* tem efeito embriotóxico e teratogênico sobre 328 *B. glabrata*

329 A tabela 1 e a figura 1 (A - E) e exibem as concentrações letais (LC), LC₁₀,
330 LC₅₀ e LC₉₀) e o efeito embriotóxico, respectivamente, contra estádios evolutivos de
331 *B. glabrata* expostos ao extrato etéreo de *C. substellata*.

332 As CL₅₀ para os estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage
333 foi de 1,59, 2,47, 3,39, 2,36 e 0,92 µg/mL (tabela 1). No estágio de blástula (Figura 1
334 A) mortalidade significativa (p < 0,05) é registrada na concentração de 1,25 µg/mL e
335 quando expostos às concentrações de 2,0, 2,5, e 3,0 g/mL a mortalidade foi de 75%,
336 96% e 100%, respectivamente. Em gástrula (Figura 1 B), mortalidade significativa foi

337 registrada a partir 2,0 µg/mL ($p < 0,05$), e para as concentrações de 2,5 e 2,75
338 µg/mL ($p < 0,01$) a mortalidade foi de 48%; enquanto 3,0 e 3,5 µg/mL ($p < 0,001$)
339 causaram 86% e 100% de mortalidade, respectivamente. Contra trocófora, (Figura 1
340 C) mortalidade superior a 50% é alcançada nas concentrações de 3,0 3,5 e 4,0
341 µg/mL; mortalidade superior a 99% é alcançada para 4,5 e 5,0 µg/mL ($p < 0,001$).
342 Concentrações inferiores a 2,5 µg/mL não apresentaram efeito embriotóxico
343 significativo contra véliger (Figura 1 D). No entanto, 2,5 µg/mL do extrato etéreo de
344 *C. substellata* foi capaz de causar 54,67% de mortalidade; enquanto 3,0, 3,5, 4,0
345 µg/mL resultaram em 70,33%, 86,67% e 100% de mortalidade, respectivamente.
346 Com relação à hippo stage (Figura 1 E), as concentrações de 0,75 – 3,0 µg/mL
347 causaram mortalidade variando de 39,0% até 100% ($p < 0,001$).

348 Durante todo o período de experimento, embriões do grupo controle negativo
349 (C2) expostos à solução com 0,5% de DMSO demonstraram desenvolvimento
350 semelhante aos embriões expostos apenas a água de clorada filtrada (C1) (Figura 2
351 A – E). A exposição à niclosamida (1,0 µg/mL) causou 100% mortalidade para todos
352 os estádios embrionários (figure 2 F – J).

353 As alterações morfológicas da atividade embriotóxica do extrato etéreo de *C.*
354 *substellata* sobre *B. glabrata* são mostradas na Figura 2 (K – O). Entre os efeitos
355 tóxicos e teratogênicos, observamos embriões mortos (2), malformados (3) e com
356 atraso no desenvolvimento (4).

357 3.3 Extrato etéreo de *C. substellata* tem toxicidade contra adultos *B. glabrata*,
358 causando mortalidade e reduzindo a fecundidade

359 A figura 3 A e a tabela 1 mostram o efeito moluscicida e a concentração letal
360 (CL) sobre adultos *B. glabrata* expostos durante 24h (dia 1) ao extrato etéreo de *C.*
361 *substellata*. Neste intervalo de exposição, a concentração de 3,0 µg/mL causou

362 mortalidade de 100%, seguida das concentrações de 2,5, 2,0, 1,5 e 1,0 que resultam
363 em 80%, 40%, 10% e 0.0% de mortalidade, respectivamente. A CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀
364 são alcançadas em concentrações de 1,59 µg/mL (1,51 - 1,66), 2,11 µg/mL (2,04 -
365 2,19) e 2,64 µg/mL (2,57 - 2,72), respectivamente. Os caramujos mortos após a
366 exposição apresentaram estiramento e edema da massa cefalópode, aumento da
367 secreção de muco e liberação de hemolinfa. Os sobreviventes foram observados
368 quanto a sua mortalidade (figura 3 A, dia 2 - 8) e fecundidade (figura 3 B) durante
369 sete dias consecutivos após exposição ao extrato etéreo de *C. substellata*. Após as
370 24h de exposição não houve mortalidade em nenhuma concentração (figura 3 A). No
371 entanto, a exposição ao extrato etéreo de *C. substellata* causou mudança no padrão
372 de fecundidade dos caramujos sobreviventes, com redução no número de
373 embriões/caramujo. Essa redução foi de 27,18, 41,98, 71,21 e 72,77% para as
374 concentrações de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 µg/mL, respectivamente. Por outro lado,
375 nenhuma concentração alterou a fertilidade dos embriões, uma vez que o número de
376 embriões mortos/malformados por caramujo foi semelhante ao grupo controle
377 negativo (C1 e C2), com variação média de $16,65 \pm 4,12$ embriões/caramujo.

378 3.4 Extrato etéreo de *C. substellata* causa alterações morfológicas em hemócitos

379 Na avaliação morfológica de hemócitos de *B. glabrata*, dois tipos celulares
380 são encontrados, o primeiro são células com uma elevada relação
381 núcleo/citoplasma, citoplasma homogêneo e sem grânulos (hialinócitos – figura 4 A).
382 O segundo são células de maior tamanho com grânulos citoplasmáticos, em formato
383 estrelado, expressando aderências e emissão de pseudópodes (granulócitos – figura
384 4 F). As frequências de hialinócitos foram de $962,3 \pm 21,31$, $952,5 \pm 23,44$, $923 \pm$
385 $55,92$ e $898 \pm 8,83$ para as concentrações de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 µg/mL,
386 respectivamente (figura 5 A). Com relação aos granulócitos as médias foram de 52,5

387 $\pm 22,55$, $71,25 \pm 50,21$, $77,0 \pm 55,92$, $102,0 \pm 8,832$, nas concentrações de 1,0, 1,5,
388 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (figura 5 A). No que se refere aos tipos celulares,
389 não houve diferença estatística entre as concentrações avaliadas, nem quando
390 comparadas aos grupos controles negativo (C1 e C2). No entanto, em todas as
391 concentrações o extrato etéreo de *C. substellata* causou alterações morfológicas em
392 hemócitos. A maior frequência de alterações foi para células com morfologia
393 indicativa de apoptose (Figura 4 G and H, figura 5 B), apresentando múltiplos
394 vacúolos, citoplasma reduzido com contorno irregular, intensa condensação da
395 cromatina e fragmentação nuclear, com médias de $237,8 \pm 45,8$, $278,2 \pm 45,7$, $294,0$
396 $\pm 70,2$, $511,8 \pm 26,6/1000$ hemócitos para as concentrações de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5
397 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todos os grupos expostos a *C. substellata* foram
398 estatisticamente significativos ($p < 0,001$) quando comparados aos controles negativo
399 (C1 e C2) para células com morfologia indicativa de apoptose. Em menor frequência,
400 visualizamos células vacuolizadas (figura 4 C), com binucleação (figura 4 B, D and I),
401 com micronúcleo (figura 4 E), e núcleos em formato de rim (figura J).

402 3.5 Extrato etéreo de *C. substellata* causa danos ao DNA de hemócitos de *B.* 403 *glabrata*

404 As alterações no DNA foram classificadas visualmente em cinco categorias
405 com base no comprimento da cauda do cometa, onde 0 indica ausência, enquanto
406 as categorias 1, 2, 3 e 4 indicam dano baixo, médio, alto e completo,
407 respectivamente (Fig 6 A). Todas as concentrações de *C. substellata* causaram
408 danos ao DNA em hemócitos de *B. glabrata* de forma dose-dependente com
409 variação de 94,66 até 99,66% (Figura 6 B). Esses danos variaram de 1 - 3 nas
410 concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de *C. substellata*
411 causou danos níveis 3 e 4 em 33,33% e 16,0% do DNA dos hemócitos,

412 respectivamente (figura 6C). Aumento significativo ($p < 0,001$) no índice de dano ao
413 DNA foi observado em todas as concentrações do extrato de *C. substellata* quando
414 comparado ao controle negativo (C1 e C2) (figura 5 D), com aumentos de 107,57%,
415 110,09%, 164,63% e 207,06% para as concentrações de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$,
416 respectivamente.

417 3.6 Extrato etéreo de *C. substellata* apresenta toxicidade contra cercárias de *S.*
418 *mansoni*

419 De acordo com a tabela 2, o extrato etéreo de *C. substellata* apresenta efeito
420 sobre cercárias de *S. mansoni* de forma tempo e dose dependente. Após 15 min de
421 exposição, alterações na motilidade foram observadas nas concentrações a partir de
422 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Neste intervalo de tempo, as cercárias expostas às concentrações de 2,5
423 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram movimentos reduzidos; adicionalmente, nas
424 concentrações de 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ as cercárias exibiam rotação intensa sobre o
425 mesmo eixo. Mortalidade maior que 50% foi registrada 30 min após exposição na
426 concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e esse mesmo percentual de mortalidade é causado pela
427 concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ após 120 min. No último intervalo de observação,
428 letalidade total foi causada nas concentrações de 5,0, 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$; essas
429 cercárias apresentavam corpo cercariano com vacúolos e separado da cauda
430 (Figura 7 C). Nos grupos controles negativos (C1 e C2) as cercárias apresentaram
431 movimentos típicos, corpo cercariano e cauda preservados e ausência de
432 mortalidade durante todo experimento (Figura 7 A). Controle positivo (NCL) causou
433 100% mortalidade após 15 min de exposição, as cercárias apresentavam retração,
434 edema e grânulos no corpo cercariano e cauda (Figura 7 B).

435

436 3.7 O extrato etéreo de *C. substellata* não exibiu toxicidade sobre *Artemia salina*

437 De acordo com a figura 8, o extrato etéreo de *C. substellata* mostrou-se
438 atóxico sobre *A. salina* em todas as concentrações aqui testadas, resultado
439 semelhante aos grupos controles negativo (C1 e C2).

440

441 **4 Discussão**

442 Este estudo reporta pela primeira vez a toxicidade do extrato etéreo do líquen
443 *C. substellata* sobre diferentes estádios embrionários e adultos *B. glabrata*, seu
444 efeito citotóxico e genotóxico sobre células hemocitárias, além da atividade sobre
445 cercárias de *S. mansoni* e avaliação ecotoxicológica sobre o bioindicador *Artemia*
446 *salina*. Sabe-se que atividades biológicas atribuídas a extratos liquênicos são
447 resultados de efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos de seus constituintes. É
448 importante entender que os metabólitos presentes no extrato, bem como suas
449 proporções, se relacionam não só com resposta biológica exercida, mas também
450 com a descoberta de novos alvos biológicos. Além disto, compostos de extratos
451 podem resultar em melhor resposta biológica quando comparados aos seus
452 constituintes isolados em doses proporcionais (Williamson, 2001; Ma et al., 2009;
453 Carmona e Pereira, 2013; Niemeyer et al., 2013). O efeito sinérgico resultado da
454 interação de metabólitos liquênicos aumenta a biodisponibilidade de substâncias
455 bioativas com possível redução nas doses/concentrações empregadas, e assim uma
456 possível redução da toxicidade e efeitos adversos (van Vuuren e Viljoen, 2011;
457 Santiago et al., 2018; ; Araújo et al., 2019b; Araújo et al., 2020a).

458 Em nosso estudo, as análises cromatográficas (CCD e CLAE) revelaram que
459 a composição química do extrato etéreo *C. substellata* apresenta os ácidos estitíco
460 (4,12%) nortístico (2,14%) e úsnico (92,58%), resultados que corroboram com os
461 estudos de Huovinen e Ahti (1986), Ribeiro et al. (2006) e Santiago et al. (2018). O

462 ácido úsnico destaca-se como metabólito majoritário nos gêneros *Cladonia*, *Usnea*,
463 *Lecanora*, *Ramalina*, *Parmelia* e *Evernia* (Ingólfssdóttir, 2002). Particularmente, em *C.*
464 *substellata* o ácido úsnico representa 90% a 96,01% da sua composição química,
465 enquanto os demais ácidos são encontrados em menores percentuais (Huovinen e
466 Ahti, 1986; Pereira 1991; Ahti et al., 1993).

467 No presente estudo as concentrações do extrato etéreo de *C. substellata* para
468 alcançar letalidade em metade da população de caramujos (CL₅₀) nos estádios de
469 blástula, gástrula, trocófora, véliger, hippo stage e adultos *B. glabrata* foram de 1,59,
470 2,47, 3,39, 2,36, 0,92 e 2,11 µg/mL (tabela 1), respectivamente. Com relação ao
471 potencial moluscicida de *C. substellata*, Araújo et al. (2018a) reportam efeitos tóxicos
472 do ácido úsnico isolado desta mesma espécie sobre blástula, gástrula, trocófora,
473 véliger e adultos *B. glabrata* com CL₅₀ de 1,38, 3,47, 5,11, 2,93, e 2,12 µg/mL,
474 respectivamente. Em outro estudo, Martins et al., (2014) avaliaram a toxicidade do
475 usnato de potássio sintetizado a partir do ácido úsnico extraído de *C. substellata*
476 sobre blástula e adultos *B. glabrata* no qual as CL₅₀ para este estágio e indivíduos
477 adultos foram de 5,77 e 0,92µg/mL, respectivamente. Aqui, o extrato de *C.*
478 *substellata* mostrou atividade semelhante ao ácido úsnico e usnato de potássio
479 sobre a fase de blástula. Por outro lado, o extrato de *C. substellata* alcançou LC₅₀
480 em concentrações inferiores para os demais estádios embrionários. Frente a
481 caramujos adultos, o extrato de *C. substellata* alcançou LC₅₀ semelhante ao ácido
482 úsnico, mas foi inferior (2,11 µg/mL) quando comparado ao usnato de potássio (5,77
483 µg/mL).

484 A atividade moluscicida, contra embriões e adultos de *B. glabrata*, e sobre
485 cercárias de *S. mansoni* do extrato etéreo do líquen *Ramalina aspera* e do ácido
486 divaricático, molécula isolada deste líquen, foi demonstrada por Silva et al. (2018;

487 2019). Após 24 h de exposição, o extrato etéreo de *R. aspera* apresenta LC₉₀ contra
488 blástula, gástrula, trocófora, veliger e adultos nas concentrações de 22,78, 24,23,
489 16,63 e 16,03 e 8,66 µg/mL, respectivamente. Enquanto, a CL₉₀ do ácido divaricático
490 para os estádios embrionários foi de 20 µg/mL e para adultos foi de 5,49 µg/mL.
491 Martins et al. (2017) demonstraram que o extrato etéreo de *Cladia aggregata*
492 exerceu efeito embriotóxico em 50 e 100 µg/mL e moluscicida em 20-25 µg/mL,
493 enquanto o ácido barbático, molécula isolada líquen, não exibe efeitos embriotóxicos
494 e a letalidade para adultos foi em concentrações iguais às do extrato etéreo. Em
495 nosso estudo, a CL₉₀ para os estádios embrionários variou de 1,71 – 5,65 µg/mL e
496 caramujos adultos foi de 2,64 µg/mL (tabela 1), concentrações dentro das
497 recomendações para novos candidatos moluscicidas, uma vez que, segundo a
498 Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983), extratos brutos são potenciais
499 moluscicidas quando apresentam 90% de mortalidade (CL₉₀) sobre caramujos em
500 concentrações iguais ou inferiores a 100 µg mL (WHO, 1983).

501 Estudos relatam a eficácia de vários compostos ricos em fenóis para o
502 controle de moluscos (Upadhyay and Singh, 2011; Araújo et al., 2018a; Faria et al.
503 2018; Silva et al., 2018). Ainda não se conhece o mecanismo de ação do extrato
504 etéreo de *C. substellata* sobre embriões *B. glabrata*, mas seus constituintes fenólicos
505 poderiam ser responsáveis por causar toxicidade e efeito teratogênico através da
506 permeabilidade nas membranas e na massa gelatinosa que protege os embriões,
507 como sugerido por Araújo et al. (2018b). Embriões com atraso no desenvolvimento e
508 malformados foram alterações encontradas também em estudos que exploraram o
509 potencial moluscicida de extratos e moléculas isoladas de líquens (Araújo et al.,
510 2018a,b; Silva et al., 2019). Em ratas gestantes, o efeito teratogênico do ácido
511 úsnico de *C. substellata* durante o período de organogênese revela redução no

512 número de fetos viáveis e do seu peso corporal, além de alterações morfológicas
513 como exposição do globo ocular, atrofia dos membros e redução no número de
514 megacariócitos hepático (Silva et al., 2017). Neste sentido, acreditamos que o
515 extrato etéreo de *C. substellata* possa alterar o processo de gastrulação, que
516 resultou em atraso no desenvolvimento e malformação em embriões *B. glabrata*.
517 Este é um mecanismo importante para o controle populacional de caramujos com
518 importância em saúde pública, uma vez que segundo Oliveira-Filho et al. (2010),
519 Araújo et al. (2021b), Batista et al. (2022) embriões com atraso no desenvolvimento
520 e malformação raramente eclodem e/ou na maioria das vezes, morrem após a
521 eclosão.

522 A toxicidade do extrato etéreo de *C. substellata* sobre adultos *B. glabrata*
523 causou estiramento e edema da massa cefalópode, aumento da secreção de muco
524 e liberação de hemolinfa. Esses achados podem ser causados pela interrupção do
525 equilíbrio osmótico, resultando em danos tissulares e alterações fisiológicas, como
526 reportado por Batista et al. (2022). Moluscidas capazes de causar mudanças
527 morfológicas são importantes, pois podem reduzir a capacidade reprodutiva de *B.*
528 *glabrata*, conseqüentemente reduzindo a população de caramujos, os riscos de
529 transmissão do *S. mansoni* e a prevalência da esquistossomose (Araújo et al., 2020;
530 Santos et al., 2020). Ademais, além de possuir ciclo embrionário curto, devido às
531 suas características fisiológicas (monóicas), *B. glabrata* durante a fase adulta
532 repopoa rapidamente os habitats aquáticos. Em apenas três meses, um caramujo é
533 capaz de produzir cerca de 10 milhões de descendentes (Coelho e Caldeira, 2016).
534 Em nosso estudo, após 24h de exposição ao extrato etéreo de *C. substellata* os
535 caramujos sobreviventes foram avaliados durante 7 dias consecutivos e

536 permaneceram vivos (figura 3 A), no entanto tiveram sua capacidade reprodutiva
537 afetada, uma vez que houve redução de ~70% de embriões/caramujo (figura 3 B).

538 O sistema imunológico dos moluscos consiste em elementos celulares e
539 humorais. Os hemócitos são componentes do sistema imunológico de moluscos,
540 como *B. glabrata*, e constituem a principal e imediata defesa celular contra agentes
541 químicos, físicos e/ou biológicos, desempenhando diferentes papéis nas reações de
542 defesa do hospedeiro, incluindo fagocitose, encapsulamento e produção de espécies
543 reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e peptídeo antimicrobiano (Wang
544 et al., 2017; Ibrahim et al., 2018; Melo et al., 2020). Assim, a avaliação quantitativa e
545 qualitativa de hemócitos é objeto de estudo para a busca de novos candidatos
546 moluscidas, bem como para a elucidação de seus mecanismos de ação (Galloway
547 and Depledge, 2001; Ibrahim et al., 2018; Silva et al., 2019; Araújo et al., 2021b). No
548 presente estudo, *B. glabrata* expostos ao extrato etéreo de *C. substellata*
549 apresentaram semelhança com o grupo controle (C1 e C2) na proporção de
550 hemócitos hialinócitos e granulócitos (figura 5 A). Por outro lado, o número de
551 hemócitos com morfologia indicativa de apoptose foi significativamente maior
552 quando comparado aos grupos controle (C1 e C2), e o aumento ocorreu de forma
553 dose dependente (figura 5 B). Ersoz et al., (2017) ao explorar o extrato do lichen
554 *Cladonia pocillumon* reportaram aumento de apoptose em células MCF-7. Nossos
555 resultados corroboram com os estudos de Siqueira et al. (2020), ao estudar a
556 exposição de adultos *B. glabrata* ao lodo de esgoto doméstico e de Araújo et al.
557 (2021b) ao explorar a toxicidade do usnato de potássio sobre hemócitos de *B.*
558 *glabrata*. Em contra partida, Silva et al. (2019), ao avaliar o extrato etéreo do líquen
559 *Ramalina aspera*, observaram uma maior diversidade de alterações morfológicas em
560 hemócitos de *B. glabrata* como, hemócitos com micronúcleo, binucleados e

561 trinucleados, além de hemócitos com apoptose celular em maior frequência. Ainda
562 com relação ao usnato de potássio obtido do extrato etéreo de *C. substellata*,
563 estudos reportam uma possível rota de ação a partir dos elementos químicos de sua
564 estrutura molecular (Ranke et al., 2004; Li et al., 2014). O usnato de potássio de *C.*
565 *substellata* possui dienos conjugados (heterocíclicos), elemento catiônico e grupos
566 OH e metil, que em contato com a superfície celular se difundem através da
567 membrana, causando alterações em sua permeabilidade e metabolismo energético
568 por meio de distúrbios na cadeia de transporte de elétrons, alterando assim a
569 bioquímica e a fisiologia da célula, responsável pela apoptose celular e danos ao
570 DNA (Ingólfssdóttir, 2002; Roberts e Costelo, 2003; Joseph et al., 2009; Araújo et al.,
571 2021).

572 Através do ensaio cometa, método sensível que avalia danos ao DNA, foi
573 possível concluir que o extrato etéreo de *C. substellata* apresenta atividade
574 genotóxica sobre o DNA de hemócitos de *B. glabrata* (figura 6). Assim como
575 sugerido por Araújo et al. (2021b), acreditamos que os efeitos deletérios sobre os
576 hemócitos e os danos ao DNA possam estar correlacionados com a presença
577 desses elementos químicos, que, mesmo em baixas concentrações, tornam-se
578 tóxicos para *B. glabrata*, modificando a funcionalidade de organelas celulares e
579 componentes de grande importância, como DNA nuclear e mitocondrial, além de
580 inibir certas enzimas envolvidas no processo de reparo do material genético,
581 causando danos irreversíveis e alterações conformacionais no DNA, ciclo celular e,
582 consequentemente apoptose celular. Danos ao DNA, via produção de espécies
583 reativas de oxigênio (ROS), como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de
584 hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), são reportados como mecanismo de ação

585 da atividade anticancerígena de extratos de líquens (Zambare e Christopher, 2012;
586 Studzińska-Sroka et al., 2021;Tripathi et al., 2022).

587 Estudos realizados com compostos e extratos naturais visam obter atividades
588 farmacológicas altamente seletivas sem efeitos tóxicos indesejados.. Neste sentido,
589 Emsen and Kolukisa (2020) investigaram os efeitos citogenéticos e oxidativos de
590 extratos metanólicos e aquosos de *Cladonia chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.)
591 Sprengel, *Dermatocarpon miniatum* (L.) W. Mann and *Parmelia saxatilis* (L.) e
592 revelaram que os extratos de líquen não aumentaram o nível de genotoxicidade na
593 cultura de linfócitos periféricos humanos. Resultados que corroboram com Silva et
594 al. (2021) que não evidenciaram citotoxicidade em células mononucleares do
595 sangue periférico humano do ácido divaricático de *Canoparmelia texana* (Líquén).

596 Um moluscicida desejado além de apresentar ação contra estádios
597 embrionários e caramujos adultos deve apresentar ação contra cercária de
598 *Schistosoma* spp., fase evolutiva infecciosa, reduzindo assim o risco de infecção. O
599 extrato etéreo do líquen *Ramalina aspera* apresentou ação contra cercárias de *S.*
600 *mansoni*, no qual após 60 min de exposição a 20 µg/mL ocorreu 100% de
601 mortalidade, com ruptura do corpo cercariano da cauda (Silva et al., 2019). Este
602 último evento também foi observado por Martins et al. (2017), que, além de alcançar
603 100% de mortalidade das cercárias a 100 µg/mL do ácido barbático do líquen *Cladia*
604 *aggregata* após 15 min de exposição, as concentrações subletais (0,25 - 10 µg/mL
605 resultaram em motilidade reduzida. A redução da motilidade e alterações
606 morfológicas de cercárias reduz seu potencial infeccioso, como reportado por Kiros
607 et al. (2014). Neste estudo, cercárias expostas a 18,7 µg/mL do extrato aquoso de
608 *Glinus lotoides* (Molluginaceae) causou alterações na motilidade e na morfologia das
609 cercárias, resultando na diminuição do potencial de penetração em camundongos,

610 os quais tiveram carga parasitária reduzida em 91,2%. Esses achados corroboram
611 com nossos resultados, uma vez que, além da mortalidade, cercárias de *S. mansoni*
612 expostas ao extrato etéreo de *C. substellata* apresentaram redução na motilidade,
613 alterações morfológicas e ruptura do corpo cercariano da cauda de forma tempo e
614 dose-dependente (tabela 2 e figura 7C).

615 Através do ensaio de toxicidade ambiental utilizando *A. salina* é possível
616 avaliar risco ambiental do etéreo de *C. substellata*. *A. salina* apresenta sensibilidade
617 a diversas substâncias, o que o torna um ótimo bioindicador de toxicidade ambiental
618 (Cantanhede et al., 2010; Costa et al., 2015). O usnato de potássio e o ácido úsnico
619 de *C. substellata* apresentaram toxicidade frente a *A. salina* com CL₅₀ de 2,6 µg/mL
620 e 2,46 µg/mL, respectivamente (Martins et al., 2014; Araújo et al., 2018a). Em
621 contrapartida, em nosso estudo, nenhuma concentração (1 - 5 µg/mL) do etéreo de
622 *C. substellata* apresentou toxicidade frente a *A. salina* (Figura 8). Bomfim et al.
623 (2009) relataram LC₅₀ para o extrato de clorofórmio de *C. substellata* a 8,6 µg/mL em
624 *A. salina*. Semelhante ao nosso resultado, os extratos etéreos dos líquens *C.*
625 *aggregata* e *R. aspera* e suas moléculas isoladas, BAR e ácido divaricático,
626 respectivamente, apresentaram concentrações ambientalmente seguras (Martins et
627 al., 2017a; Silva et al., 2018; 2019). A fitotoxicidade dos extratos (entre eles o
628 etéreo) e do ácido úsnico de *C. substellata* foi avaliada em *Allium cepa* L e não foi
629 encontrado efeito inibitório significativo dos extratos sobre a germinação, enquanto
630 que para o ácido úsnico a inibição foi observada a partir da concentração de 290,6
631 mM (Yano-Melo et al., 1999).

632 **5. Conclusão**

633 Os resultados do presente estudo demonstram que o extrato etéreo de *C.*
634 *substellata* é um candidato a agente moluscicida, uma vez que mostrou ser efetivo

635 no controle populacional de embriões e adultos de *B. glabrata*, hospedeiro
636 intermediário do *S. mansoni*. O extrato causou danos hemocitários e genotóxicos em
637 caramujos adultos, apresentou ação contra cercárias, fase infectante para o
638 hospedeiro definitivo, o homem, e foi atóxica contra bioindicador ambiental, fatores
639 imprescindíveis para interrupção do ciclo biológico do *S. mansoni* e controle da
640 esquistossomose.

641

642 **Contribuições dos autores**

643 J.V.R. Rocha, H.D.A. Araújo, A.L. Aires: developed the studied protocols.
644 J.V.R. Rocha, T.W.A. Albuquerque, D.R. Pereira, N.H. Silva, M.C.P.A. Albuquerque,
645 A.M.M.A. Melo, L.C.B.B. Coelho, H.A.M.F. Silva, H.D.A. Araújo and A.L. Aires:
646 realizaram os ensaios e/ou estiveram envolvidos na análise e interpretação de todos
647 os dados. J.V.R. Rocha, L.C.B.B. Coelho, H.A.M.F. Silva, H. D. A. Araújo e A.L.
648 Aires: contribuíram com a redação do manuscrito e/ou revisão crítica e conteúdo
649 intelectual. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

650

651 **Agradecimentos**

652 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
653 e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e L.C.B.B. Bolsa Coelho (309923/2019-0);
654 também, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES
655 nº 001) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
656 (FACEPE). H.A.D. Araújo agradece à FACEPE pela Bolsa de Fixação de
657 Pesquisador (BFP-0080-2.08/20).

658

659 **Conflito de interesse**

660 The authors have declared that there is no conflict of interest.

661

662 **Referências**

663 Ahti, T., Stenroos, S., Xavier Filho, L., 1993. The lichen family Cladoniaceae in
664 Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. Trop. Biol. 7, 55-70. Doi:
665 10.11646/bde.7.1.6.

666 Ahti, T., 2000. Cladoniaceae: The Organization for Flora Neotropica 78. New York
667 Botanical Garden Press. 1-362.

668 Araújo, H.D.A., Silva, H.A.M.F., Silva Júnior, J.G., Albuquerque, M.C.P.A., Coelho,
669 L.C.B.B., Aires, A.L., 2021a. The natural compound hydrophobic usnic acid
670 and hydrophilic potassium usnate derivative: Applications and comparisons.
671 Molecules. 26, 1-11. Doi: 10.3390/molecules26195995.

672 Araújo, H.D.A., Silva, H.A.M.F., Siqueira, W.N., Santos, V.H.B., Lima, M.V., Silva
673 Júnior, J.G., Silva, N.H., Albuquerque, M.C.P.A., Melo, A.M.M.A., Aires, A.L.,
674 Coelho, L.C.B.B., 2021b. Sublethal concentrations of usnic acid potassium salt
675 impairs physiological parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)
676 (Pulmonata: Planorbidae) infected and not infected with *Schistosoma*
677 *mansoni*. Acta Trop. 222, 1-13. Doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106067.

678 Araújo, H.D.A., Silva, N.H., Albuquerque, M.C.P.A., Aires, A.L., Lima, V.L.M., 2020a.
679 Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced activity
680 against *Schistosoma mansoni in vitro*. Exp. Parasitol. 208, 1-5. Doi:
681 10.1016/j.exppara.2019.107779.

682 Araújo, H.D.A., Santos, V.H.B., Brayner, F.A., Alves, L.C., Silva, N.H., Albuquerque,
683 M.C.P.A., Aires, A.L., Lima, V.L.M., 2020b. *In vitro* activity of usnic acid
684 potassium salt against different developmental stages of *Schistosoma*

- 685 *mansoni*: An ultrastructural study. Acta Trop. 201, 1-11. Doi:
686 10.1016/j.actatropica.2019.105159.
- 687 Araújo, H.D.A., Aires, A.L., Soares, C.L.R., Brito, T.G.S., Nascimento, W.M., Martins,
688 M.C.B., Silva, T.G., Brayner, F.A., Alves, L.C., Silva, N.H., Albuquerque,
689 M.C.P.A., Lima, V.L.M., 2019a. Usnic acid potassium salt from *Cladonia*
690 *substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and *in vitro* anthelmintic activity
691 and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. Acta
692 Trop. 192, 1–10. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.12.024.
- 693 Araújo, H.D.A., Silva Júnior, J.G., Oliveira, J.R.S., Ribeiro, M.H.M.L., Martins, M.C.B.,
694 Bezerra, M.A.C., Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Melo-Júnior, M.R.,
695 Pontes Filho, N.T., Pereira, E.C., Silva, D.J.R., Anjos, J.V., Falcão, E.P.S.,
696 Silva, N.H., Lima, V.L.M., 2019b. Usnic acid potassium salt: evaluation of the
697 acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. Molecules. 24, 1-17.
698 Doi: 10.3390/molecules24112042.
- 699 Araújo, H.D.A., Silva, L.R.S., Siqueira, W.N., Fonseca, C.S.M., Silva, N.H., Melo,
700 A.M.M.A., Martins, M.C.B., Lima, V.L.M., 2018a. Toxicity of usnic acid from
701 *Cladonia substellata* (lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*.
702 Acta Trop. 179, 39-43. Doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.007.
- 703 Araújo, H.D.A., Melo, A.M.M.A., Siqueira, W.N., Martins, M.C.B., Aires, A.L.,
704 Albuquerque, M.C.P.A., Silva, N.H., Lima, V.L.M., 2018b. Potassium usnate
705 toxicity against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and
706 *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop. 188, 132-137. Doi:
707 10.1016/j.actatropica.2018.08.006.
- 708 Batista, J.J., Araújo, H.D.A., Aguiar, T.W.A., Ferreira, S.A.O., Lima, M.V., Pereira,
709 D.R., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., Melo, A.M.M.A., Albuquerque,

- 710 M.C.P.A., Aires, A.L., Coelho, L.C.B.B., 2022. Toxic, cytotoxic and genotoxic
711 effect of saline extract and fraction of *Parkia pendula* seeds in the
712 developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 - intermediate host)
713 and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. *Acta*
714 *Trop.* 228, 1-11. Doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106312.
- 715 Blanch, M., Blanco, Y, Fontaniella, B, Legaz, ME, Vicente, C, 2001. Production of
716 phenolics by immobilized cells of the lichen *Pseudevernia furfuracea*: the role
717 of epiphytic bacteria. *Int. Microbiol.* 4, 89-92. Doi: 10.1007/s101230100019.
- 718 Bomfim, R.R., Araújo, A.A.S., Cuadros-Orellana, S., Melo, M.G.D., Quintans, L.J.,
719 Júnior., Cavalcanti, S.C.H. 2009. Larvicidal activity of *Cladonia substellata*
720 extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *Lat. Am. J.*
721 *Pharm.* 2009, 28, 580-584.
- 722 Bugni, T.S., Andjelic, C.D., Pole, A.R., Rai, P., Ireland, C.M., Barrows, L.R., 2009.
723 Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-
724 inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia.* 80, 5, 270-273. Doi:
725 10.1016/j.fitote.2009.03.003.
- 726 Calcott, M.J., Ackerley, D.F, Knight, A, Keyzers, R.A, Owen, J.G., 2018. Secondary
727 metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* 47, 1730-1760. Doi:
728 10.1039/c7cs00431a
- 729 Carmona, F., Pereira, A.M.S., 2013. Herbal medicines: old and new concepts, truths
730 and misunderstandings. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 2, 379-385. Doi:
731 10.1590/S0102-695X2013005000018.
- 732 Cetin, H., Tufan-Cetin, O., Turk, A.O., Tay, T., Candan, M., Yanigoklu, A., Sumbul,
733 H., 2008. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic

- 734 acid, against the larvae of the house mosquito, *Culex pipiens* L. Parasit. Res.
735 102, 1277-1279. Doi: 10.1007/s00436-008-0905-8
- 736 Chen, Y.Q., Xu, Q.M., Liu, Y.L., Li, X.R., Yang, S.L., Zhuge, H.X., 2012. Laboratory
737 evaluation of the molluscicidal activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel
738 saponins against the snail *Oncomelania hupensis*. Biomed. Environ. Sci. 25,
739 2, 224-229. Doi: 10.3967/0895-3988.2012.02.015.
- 740 Coelho, P., Caldeira, R.L., 2016. Critical analysis of molluscicide application in
741 schistosomiasis control programs in Brazil. Infect. Dis. Poverty. 5, 1-6. Doi:
742 10.1186/s40249-016-0153-6.
- 743 Collins, A.R., Oscoz, A.A., Gaivão, I., Brunborg, G., Giovannelli, L., Kruszewski, M.,
744 Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The Cometassay: topical issues. Mutagenesis
745 23, 143–151. Doi: 10.1093/mutage/gem051.
- 746 Culberson, C. F. Improved conditions and new data for the indication of lichen
747 products by standardized thin layer-chromatographic method. Journal of
748 Chromatography. 72, 1113-1125, 1972. Doi: 10.1016/0021-9673(72)80013-X
- 749 Emsen, B., Yildirim, E., Aslan, A. 2015. Insecticidal activities of extracts of three
750 lichen species on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Plant
751 Protect. Sci. 51, 155-161. Doi: 10.17221/101/2014-PPS.
- 752 Emsen, B., Kolukisa, A.L., 2020. Cytogenetic and oxidative effects of three lichen
753 extracts on human peripheral lymphocytes. Z. Naturforsch. C. J. Biosci. 76, 7-
754 8, 291-299. Doi: 10.1515/znc-2020-0135.
- 755 Ersoz, M., Coskun, Z.M., Acikgoz, B., Karalti, I., Cobanoglu, G., Cesal, C., 2017. *In*
756 *vitro* evaluation of cytotoxic, anti-proliferative, anti-oxidant, apoptotic, and anti-
757 microbial activities of *Cladonia pocillum*. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). 63,
758 7, 69-75. Doi: 10.14715/cmb/2017.63.7.12.

759

760 Faria, R.X., Rocha, L.M., Souza, E.P.B.S.S., Almeida, F.B., Fernandes, C.P., Santos,
761 J.A.A., 2018. Molluscicidal activity of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard on
762 *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Acta Trop. 178, 163-168. Doi:
763 10.1016/j.actatropica.2017.11.012.

764 Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M.P., Crespo, A., 2016. Antioxidant
765 potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic
766 review. Pharm. Biol. 54, 1, 1-17. Doi: 10.3109/13880209.2014.1003354.

767 Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement
768 and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology. 10, 5-23. Doi:
769 10.1023/A:1008939520263.

770 García-Junceda, E., Vicente, C.C.C., 1991. Kinetics and stability of an immobilized
771 orsellinate depside hydrolase in polyacrylamide gel. Enzyme Microb. Technol.
772 13, 275-279. Doi: 10.1016/0141-0229(91)90142-W

773 Garty J, Tomer S, Levin T, Lehr H., 2003. Lichens as biomonitors around a coal-fired
774 power station in Israel. Environ Res. 91, 186-198. Doi: 10.1016/S0013-
775 9351(02)00057-9.

776 Goodenougha, U., Roth, R. 2021. Lichen 2. Constituents. Algal Res. 58, 1-31. Doi:
777 10.1016/j.algal.2021.102356.

778 Huovinen, K., Ahti, T., 1986. The composition and contents of aromatic lichen
779 substances in the genus *Cladonia*. Annales Botanici Fennici 23, 173-188.

780 Ibrahim, A.M., Ghoname, S.I., 2018. Molluscicidal impacts of *Anagallis arvensis*
781 aqueous extract on biological, hormonal, histological and molecular aspects of
782 *Biomphalaria alexandrina* snails. Exp. Parasitol. 192, 36-41. Doi:
783 10.1016/j.exppara.2018.07.014.

- 784 Ingólfssdóttir, K., 2002. Usnic acid. *Phytochemistry* 61, 7, 729-736. Doi:
785 10.1016/S0031-9422(02)00383-7.
- 786 Joseph, A., Lee, T., Moland, C.L., Branham, W.S., Fuscoe, J.C., Leakey, J.E.A.,
787 Allaben, W.T., Lewis, S.M., Ali, A.A., Desai, V.G., 2009. Effect of (+)-usnic acid
788 on mitochondrial functions as measured by mitochondria-specific
789 oligonucleotide microarray in liver of B6C3F1 mice. *Mitochondrion*. 9, 149-158.
790 Doi: 10.1016/j.mito.2009.02.002.
- 791 Karabacak, R.B., Tay, T., Kivanc, M., 2014. Preparation of novel antimicrobial
792 polymer colloids based on (+)- usnic acid and poly (vinylbenzyl chloride).
793 *React. Funct. Polym.* 83, 7-13. Doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.002.
- 794 Kawano, T., Okazaki, K., Ré, L., 1992. Embryonic development of *Biomphalaria*
795 *glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to
796 the main stages. *Malacologia*. 34, 25-32.
- 797 Kiroso, G., Erko, B., Giday, M., Mekonnen, Y., 2014. Laboratory assessment of
798 molluscicidal and cercariacidal effects of *Glinus lotoides* fruits. *BMC Res.*
799 *Notes*. 7, 1-7. Doi: 10.1186/1756-0500-7-220.
- 800 Legaz, M.E.E., Vicente, C., 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine
801 decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnatri* thallus.
802 *Plant Physiologie*. 71, 300–302 Doi: 10.1104/pp.71.2.300.
- 803 Li, X.Y., Dong, X.Y., Bai, X., Liu, L., Wang, J.J., 2014. The embryonic and
804 postembryonic developmental toxicity of imidazolium-based ionic liquids on
805 *Physa acuta*. *Environ. Toxicol.* 29, 697-704. Doi: 10.1002/tox.21797.
- 806 Luz, J.S., Oliveira, E.B., Martins, M.C., Silva, N.H., Alves, L.C., Santos, F.A., Silva,
807 L.L., Silva, E.C., Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural analysis of *Leishmania*

- 808 *infantum* chagasi promastigotes forms treated *in vitro* with usnic acid. Sci.
809 World J. 2015, 1-8. Doi: 10.1155/2015/617401.
- 810 Ma, X.H., Zheng, C.J., Han, L.Y., Xie, B., Jia, J., Cao, Z.W., Li, Y.X., Chen, Y.Z.,
811 2009. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their
812 mechanisms from molecular interaction and network perspectives. Drug
813 Discov. Today, 14, 11-12, 579-588. Doi: 10.1016/j.drudis.2009.03.012.
- 814 Martins, M.C., Silva, M.C., Silva, H.A., Silva, L.R., Albuquerque, M.C., Aires, A.L.,
815 Falcão, E.P., Pereira, E.C., de Melo, A.M., da Silva, N.H., 2017a. Barbatic acid
816 offers a new possibility for control of *Biomphalaria glabrata* and
817 schistosomiasis. Molecules. 22, 4, 1-11. Doi: 10.3390/molecules22040568.
- 818 Martins, M.C.B., Lima, M.J.G., Santiago, R., Buril, M.L.L., Pereira, E.C., Legaz, M.E.,
819 Vicente, C., Silva, N.H., 2017b. New biotechnological methods for producing
820 therapeutic compounds (usnic, stictic and norstictic acids) by cell
821 immobilization of the lichen *Cladonia substellata* Vainio. Biotechnol. Ind. J. 13,
822 1-13.
- 823 Martins, M.C., Silva, M.C., Silva, L.R., Lima, V.L., Pereira, E.C., Falcão, E.P., Melo,
824 A.M., da Silva, N.H., 2014. Usnic acid potassium salt: an alternative for the
825 control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). PLoS One. 9, 11, e111102. Doi:
826 10.1371/journal.pone.0111102.
- 827 Melo, E.S., Brayner, F.A., Portela Junior, N.C.P., França, I.R.S., Alves, L.C., 2020.
828 Investigation of defense response and immune priming in *Biomphalaria*
829 *glabrata* and *Biomphalaria straminea*, two species with different susceptibility
830 to *Schistosoma mansoni*. Parasitol. Res. 119, 189-201. Doi: 10.1007/s00436-
831 019-06495-4.

- 832 Meyer, B.N., Ferrigini, N.R., Putman, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin,
833 J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant
834 constituents. *Planta Med.* 45, 31-34. Doi: 10.1055/s-2007-971236.
- 835 Moloo, A., 2020. Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain
836 progress. [https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-](https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress)
837 [elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress](https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress). (Accessed 6 July
838 2021).
- 839 Moura, J.B., Vargas, A.C., Gouveia, G.V., Gouveia, J.J.S., Ramos-Júnior, J.C.,
840 Botton, S.A., Pereira, E.C., Costa, M.M. 2017. *In vitro* antimicrobial activity of
841 the organic extract of *Cladonia substellata* Vainio and usnic acid against
842 *Staphylococcus* spp. obtained from cats and dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 37, 368-
843 378. Doi: 10.1590/S0100-736X2017000400011
- 844 Muhoro, A.M., Farkas, E.É. 2021. Insecticidal and antiprotozoal properties of lichen
845 secondary metabolites on insect vectors and their transmitted protozoal
846 diseases to humans. *Diversity.* 13, 1-15. Doi: 10.3390/d13080342.
- 847 Niemeyer, K., Bell, I.R., Koithan, M., 2013. Traditional knowledge of western herbal
848 medicine and complex systems science. *J. Herb. Med.* 3, 112-119. Doi:
849 10.1016/j.hermed.2013.03.001.
- 850 Nybakken, L., Julkunen-Tiitto, R., 2006. UV-B induces usnic acid in reindeer lichens.
851 *Lichenologist.* 38, 477-485. Doi: 10.1017/S0024282906005883
- 852 Oliveira-Filho, E.C., Paumgarten, F.J., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and
853 niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
854 46, 342-350. Doi: 10.1006/eesa.2000.1924.
- 855 Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgarten,
856 F.J., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic

- 857 molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere*. 81, 2, 218-
858 227. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.038.
- 859 Olivier-Jimenez, D., Chollet-Krugler, M., Rondeau, D., Beniddir, M.A., Ferron, S.,
860 Delhaye, T., Allard, P.M., Wolfender, J.L., Sipman, H.J.M., Lücking, R.,
861 Boustie, J., Le., Pogam, P., 2019. A database of high-resolution MS/MS
862 spectra for lichen metabolites. *Sci Data*. 28, 1-11. Doi: 10.1038/s41597-019-
863 0305-1.
- 864 Pavlica, M., Klobučar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papeš, D., 2000. Detection of
865 micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed
866 to pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 465, 145-150. Doi: 10.1016/S1383-
867 5718(99)00222-3.
- 868 Pecoraro, R., Scalisi, E.M., Messina, G., Fragalà, G., Ignoto, S., Salvaggio, A.,
869 Zimbone, M., Impellizzeri, G., Brundo, M.V. 2021. *Artemia salina*: A
870 microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. *Micros Res*
871 *Tech.* 84(3), 531–536. Doi: 10.1002/jemt.23609
- 872 Pereira, E.C., Pereyra, T., Matos, S.C., Silva, N.H., Andrade, L., Vicente, C., 1995.
873 Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of
874 *Cladonia substellata* Vain. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64, 171-174. Doi:
875 10.5586/asbp.1995.024
- 876 Pereira, E.C., Silva, N.H., Campos-Takaki, G.M., Xavier Filho, L., Legaz, M.E,
877 Vicente, C., 1991. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and
878 detection of antimicrobial activity. *Bol. Soc. Brot.* 64, 173-186.
- 879 Rafanelli, S., Bacchilega, R, Stanganelli, I, Rafanelli, A., 1995. Contact dermatitis
880 from usnic acid in vaginal ovules. 33, 271-272. Doi: 10.1111/j.1600-
881 0536.1995.tb00484.x

- 882 Rancan, F., Rosan., S, Boehm., K., Fernández, E., Hidalgo, M.E., Quihot, W., Rubio,
883 C., Boehm, F., Piazena, H., Oltmanns, U., 2002. Protection against UVB
884 irradiation by natural filters extracted from lichens. *J. Photochem. Photobiol. B.*
885 68, 133-139. Doi: 10.1016/S1011-1344(02)00362-7
- 886 Ranke, J., M"olter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J.,
887 Ondruschka, B., Filser, J., Jastorff, B., 2004. Biological effects of imidazolium
888 ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell
889 viability assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 396-404. Doi: 10.1016/S0147-
890 6513 (03)00105-2.
- 891 Ribeiro, S.M., Pereira, E.C., Gusmão, N.B., Falcão, E.P., Silva, N.H., 2006. Produção
892 de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio. *Acta bot.*
893 *bras.* 20, 265-272. Doi: 10.1590/S0102-33062006000200003.
- 894 Roberts, D.W., Costello, J., 2003. QSAR and mechanism of action for aquatic toxicity
895 of cationic surfactants. *Mol. Inform.* 22, 220-225. Doi:
896 10.1002/qsar.200390015.
- 897 Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J., Cardile, V., 2012. Effect of
898 vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: role of
899 Hsp70 protein. *Chem. Biol. Interact.* 195, 1-10. Doi:
900 10.1016/j.cbi.2011.10.005.
- 901 Sahib, K., Kularate, S., Kumar S., Karunarate. V. 2008. Effect of (+)- usnic acid on
902 the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. *J. Natl. Sci. Found.*
903 36, 335-336. Doi: 10.4038/jnsfsr.v36i4.274.
- 904 Santiago, R., Martins, M.C.B., Vilaça, M.D., Barros, L.F.B., Nascimento, T., Silva,
905 N.H., Falcão, E.P.S., Legaz, M.E., Vicente, C., Pereira, E.C., 2018.
906 Phytochemical and biological evaluation of metabolites produced by alginate-

- 907 immobilized Bionts isolated from the lichen *Cladonia substellata* vain.
908 Fitoterapia. 131, 23-34. Doi: 10.1016/j.fitote.2018.10.001.
- 909 Santos, I.G.A., Bezerra L.P., Cirilo T.M., Silva L.O., Machado J.P.V., Lima P.D.,
910 Bispo M.R.S., Gomes S.D.C., Silva G.I.L.D., Alencar V.J.B., Damasceno I.A.,
911 Carvalho M.M.V., Gomes D.S., Ramos R.E.S., Santos Júnior E.G., Alves L.C.,
912 Brayner, F.A., 2020. New epidemiological profile of schistosomiasis from an
913 area of low prevalence in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 53, 1-9. Doi:
914 10.1590/0037-8682-0335-2020.
- 915 Silva, A.S., Pimentel, C.S.L., Santos, F.H.G., Araújo, H.D.A., Paiva, P.M.G., Silva,
916 N.H., Pereira, E.C., Martins, M.C.B., Buril, M.L.L., Napoleão, T.H., Falcao,
917 E.P.S., Navarro, D.M.A.F., 2021b. Insecticidal activity of the ether extract from
918 the lichen *Ramalina complanata* and an isolated metabolite (divaricatic acid)
919 against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). Biocatal. Agric.
920 Biotechnol. 35, 1-6. Doi: 10.1016/j.bcab.2021.102049.
- 921 Silva, C.R., Marinho, K.S., Silva, T.D., Ferreira, D.K., Aguiar, G.M., Martins, M.C.,
922 Santos, K.R., Aguiar Júnior, F.C., Santos, N.P., Pereira, E.C., Silva, N.H.,
923 2017. Teratogenic Effect of Usnic Acid from *Cladonia substellata* Vainio during
924 Organogenesis. Biomed. Res. Int. 2017, 1-8. Doi: 10.1155/2017/5948936.
- 925 Silva, H.A.M.F., Siqueira, W.N., Sá, J.L.F., Silva, L.R.S., Martins, M.C.B., Aires, A.L.,
926 Amâncio, F.F., Pereira, E.C., Albuquerque, M.C.P.A., Melo, A.M.M.A., Silva,
927 N.H., 2018. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria*
928 *glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop. 178, 97-102. Doi:
929 10.1016/j.actatropica.2017.09.019.
- 930 Silva, H.A.M.F., Sá, J.L.F., Siqueira, W.N., Lima, M.V., Martins, M.C.B., Aires, A.L.,
931 Albuquerque, M.C.P.A., Falcão, E.P.D.S., Buril, M.L.L., Pereira, E.C., Melo,

- 932 A.M.M.A., Silva, N.H.D., 2019. Toxicological effects of *Ramalina aspera*
933 (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae.
934 Acta Trop. 196, 172-179. Doi: 10.1016/j.actatropica.2019.05.010.
- 935 Silva, H.A.M.F., Aires, A.L., Soares, C.L.R., Sá, J.L.F., Martins, M.C.B., Albuquerque,
936 M.C.P.A., Silva, T.G., Brayner, F.A., Alves, L.C., Melo, A.M.M.A., Silva, N.H.,
937 2020. Barbatic acid from *Cladia aggregata* (lichen): Cytotoxicity and *in vitro*
938 schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of
939 *Schistosoma mansoni*. Toxicol. In Vitro, 65, 1-10. Doi:
940 10.1016/j.tiv.2020.104771.
- 941 Silva, H.A.M.F., Aires, A.L., Soares, C.L.R., Siqueira, W.N., Lima, M.V., Martins,
942 M.C.B., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, T.G., Brayner, F.A., Alves, L.C., Melo,
943 A.M.M.A., Silva, N.H., 2021 Schistosomicidal effect of divaricatic acid from
944 *Canoparmelia texana* (Lichen): *In vitro* evaluation and ultrastructural analysis
945 against adult worms of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 222, 1-9. Doi:
946 10.1016/j.actatropica.2021.106044.
- 947 Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for
948 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res.
949 175, 1, 184-191. Doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- 950 Siqueira, W.N., França, E.J., Pereira, D.R., Lima, M.V., Silva, H.A.M.F., Araújo,
951 H.D.A., Sá, J.L.F., Melo, A.M.M.A., 2020. Study of genotoxic and cytotoxic
952 effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on
953 *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Chemosphere. 249, 1-8. Doi:
954 10.1016/j.chemosphere.2020.126218.
- 955 Studzińska-Sroka, E., Majchrzak-Celińska, A., Zalewski, P., Szwajgier, D.,
956 Baranowska-Wójcik, E., Kaproń, B., Plech, T., Żarowski, M., Cielecka-Piontek,

- 957 J., 2021 Lichen-derived compounds and extracts as biologically active
958 substances with anticancer and neuroprotective properties. *Pharmaceuticals*
959 (Basel). 14, 1-24. Doi: 10.3390/ph14121293.
- 960 Tripathi, A.H., Negi, N., Gahtori, R., Kumari, A., Joshi, P., Tewari, L.M., Joshi, Y.,
961 Bajpai, R., Upreti, D.K., Upadhyay, S.K., 2022 A Review of anti-cancer and
962 related properties of lichen-extracts and metabolites. *Anticancer Agents Med*
963 *Chem.* 22, 1, 115-142. Doi: 10.2174/1871520621666210322094647.
- 964 Upadhyay, A., Singh, D.K., 2011. Molluscicidal activity of *Sapindus mukorossi* and
965 *Terminalia chebula* against the freshwater snail *Lymnaea acuminata*.
966 *Chemosphere.* 83, 4, 468-474. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.066.
- 967 Vainio, E.A., 1887. *Monographia Cladoniarum universalis. Pars I. Acta Soc. Fauna*
968 *Flora Fenn.* 4, 1–509.
969 <https://www.biodiversitylibrary.org/page/5587642#page/9/mode/1up>
- 970 Van Vuuren, S., Viljoen, A., 2011. Plant-based antimicrobial studies--methods and
971 approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med.* 77,
972 11, 1168-1182. Doi: 10.1055/s-0030-1250736.
- 973 Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L., Song, L., 2017. The
974 granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*.
975 *Dev. Comp. Immunol.* 67, 221-228. Doi: 10.1016/j.dci.2016.09.017.
- 976 WHO, World Health Organization, 1965. Molluscicide screening and evaluation.
977 *Bulletin of the World Health Organization, Geneva.*
- 978 WHO, World Health Organization, 2017. Global vector control response 2017–2030,
979 Geneva.
- 980 WHO, World Health Organization, 2022. WHO launches new guideline for the control
981 and elimination of human schistosomiasis. <https://www.who.int/news/item/22->

982 02-2022-who-launches-new-guideline-for-the-control-and-elimination-of-
 983 human-schistosomiasis (Accessed 11 Jan 2022)

984 Williamson, E.M. 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines.
 985 Phytomedicine., 8, 5, 401-409. Doi: 10.1078/0944-7113-00060.

986 Yildirim, E., Emsen, B., Aslan, A., Bula, K.Y., Ercisli, S., 2012. Insecticidal activity of
 987 lichens against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky
 988 (Coleoptera: Curculionidae). Egypt. J. Biol. Pest Control. 22, 151-156.

989 Zambare, V.P., Christopher, L.P., 2012. Biopharmaceutical potential of lichens.
 990 Pharm Biol. 50, 6, 778-798. Doi: 10.3109/13880209.2011.633089.

991

992 Legendas das Figuras

993 Fig. 1. Toxicidade do extrato etéreo de *C. substellata* sobre estádios embrionários de
 994 *B. glabrata*. (A) blástula, (B) gástrula, (C) trocófora, (D) véliger e (E) hippo stage. C1
 995 - Água filtrada e decolorada; C2 - DMSO 0,5% em água filtrada e decolorada; NCL
 996 (Niclosamida) - 1,0 µg/mL. Nível de significância *p < 0,05, **p < 0,01 ***p<0,001
 997 quando comparado a C2.

998 Fig. 2. Estágios embrionários de *B. glabrata* expostos a 0,5% de Dimetilsulfóxido
 999 (DMSO) em água filtrada e decolorada (A-E, 40x), Niclosamida a 1µg/mL de (F-J,
 1000 40x) e extrato etéreo de *C. Substellata* em diferentes concentrações (K - O, 40x).
 1001 Estádio de blástula em A, F e K; gástrula em B, G e L; trocófora em C, H e M; véliger
 1002 em D, I e N; hippo stage E, J e O. 1 - embriões normais; 2 - mortos; 3 - malformado;
 1003 4 - atraso de desenvolvimento.

1004 Fig. 3. Mortalidade e fecundidade de adultos *B. glabrata*. (A) Caramujos expostos ao
 1005 extrato etéreo de *C. substellata* durante 24 h e observados por 7 dias após
 1006 exposição; (B) média de fecundidade dos caramujos durante 7 dias após exposição
 1007 ao extrato etéreo de *C. substellata*. C1 - Água filtrada e decolorada; C2 - DMSO 0,5%
 1008 em água filtrada e decolorada; NCL - Niclosamida 1 µg/mL. Concentrações do extrato
 1009 em µg/mL.

1010 Fig. 4. Hemócitos de *B. glabrata* expostos ao extrato etéreo de *C. substellata*. (A)
 1011 Hemócito hialinócito normal; (B) hemócito hialinócito binucleado; (C) hemócito
 1012 hialinócito com vacúolo; (D) hemócito hialinócito binucleado; (E) hemócito hialinócito
 1013 com micronúcleo; (F) hemócito granulócito normal; (G) hemócito granulócito com
 1014 morfologia indicativa de apoptose; (H) hemócito granulócito com morfologia
 1015 indicativa de apoptose e vacúolos; (I) hemócito granulócito com binucleação; (J)
 1016 hemócito hialinócito com núcleo em forma de rim.

1017 Fig. 5. Alterações morfológicas e quantitativas de hemócitos de *B. glabrata* expostos
 1018 ao extrato etéreo de *C. substellata*. (A) Média de hemócitos granulócitos e
 1019 hialinócitos. (B) Frequência hemócitos com morfologia indicativa de apoptose. C1 -
 1020 Água filtrada e dechlorada. C2 - DMSO 0,5% em água filtrada e dechlorada.
 1021 Resultados expressos em média e desvio padrão (DP). Nível de significância *** $p <$
 1022 0,001 comparado ao controle negativo C2.

1023 Fig. 6. Imagens do ensaio cometa obtidas de hemócitos de *B. glabrata*, coradas com
 1024 Sybrsafe™ e danos no DNA após exposição a diferentes concentrações de extrato
 1025 etéreo de *C. substellata*. (A) Diferentes graus de dano, onde 0 indica ausência e 1 a
 1026 4 indica dano crescente ao DNA; (B) frequência de dano (DF); (C) distribuição
 1027 percentual para cada nível de dano por concentração em $\mu\text{g/mL}$; (D) índice de danos
 1028 (DI).

1029 C1: água filtrada e dechlorada; C2: DMSO 0,5% em água filtrada e dechlorada. NCL:
 1030 Niclosamida; Letalidade de 100% das cercárias (+++); letalidade superior a 50% das
 1031 cercárias (++); letalidade inferior a 50% das cercárias (+) e nenhuma letalidade (-).

1032 Fig. 7. Cercárias de *Schistosoma mansoni*. (A) Cercárias expostas a DMSO a 0,5%
 1033 em água filtrada dechlorada (C2); (B) cercárias expostas a Niclosamida (NCL) a 1.0
 1034 $\mu\text{g/mL}$ destacando retração, edema e grânulos no corpo cercariano e cauda; (C)
 1035 cercárias expostas ao extrato etéreo de *C. substellata* a 5 $\mu\text{g/mL}$ após 120 min,
 1036 destacando corpo cercariano com vacúolos e cauda separados.

1037 Fig. 8. Toxicidade do extrato etéreo de *C. substellata* sobre o bioindicador *A. salina*
 1038 após 24 h de exposição. C1 - Água filtrada e dechlorada; C2 - DMSO 0,5% em água
 1039 filtrada e dechlorada.

Table 1. Lethal concentrations (LC) of ethereal extract of *C. substellata* ($\mu\text{g/mL}$) after 24 h of exposure on embryos and adults of *B. glabrata*.

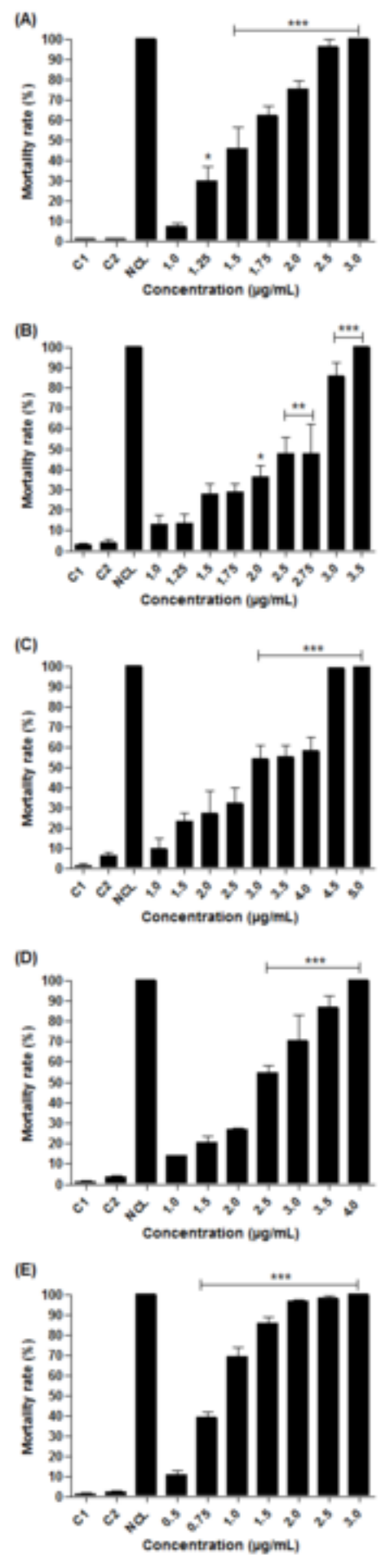
Experimental groups	Lethal concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Blastula	0.93 (0.91 - 0.95)	1.59 (1.57 - 1.61)	2.25 (2.24 - 2.27)
Gastrula	1.23 (1.20 - 1.26)	2.47 (2.45 - 2.50)	3.72 (3.69 - 3.74)
Trocophore	1.12 (1.06 - 1.18)	3.39 (3.33 - 3.45)	5.65 (5.59 - 5.71)
Veliger	1.22 (1.19 - 1.25)	2.36 (2.33 - 2.39)	3.49 (3.46 - 3.52)
Hippo Stage	0.12 (0.15 - 0.15)	0.92 (0.89 - 0.94)	1.71 (1.69 - 1.74)
Adult snails	1.59 (1.51 - 1.66)	2.11 (2.04 - 2.19)	2.64 (2.57 - 2.72)

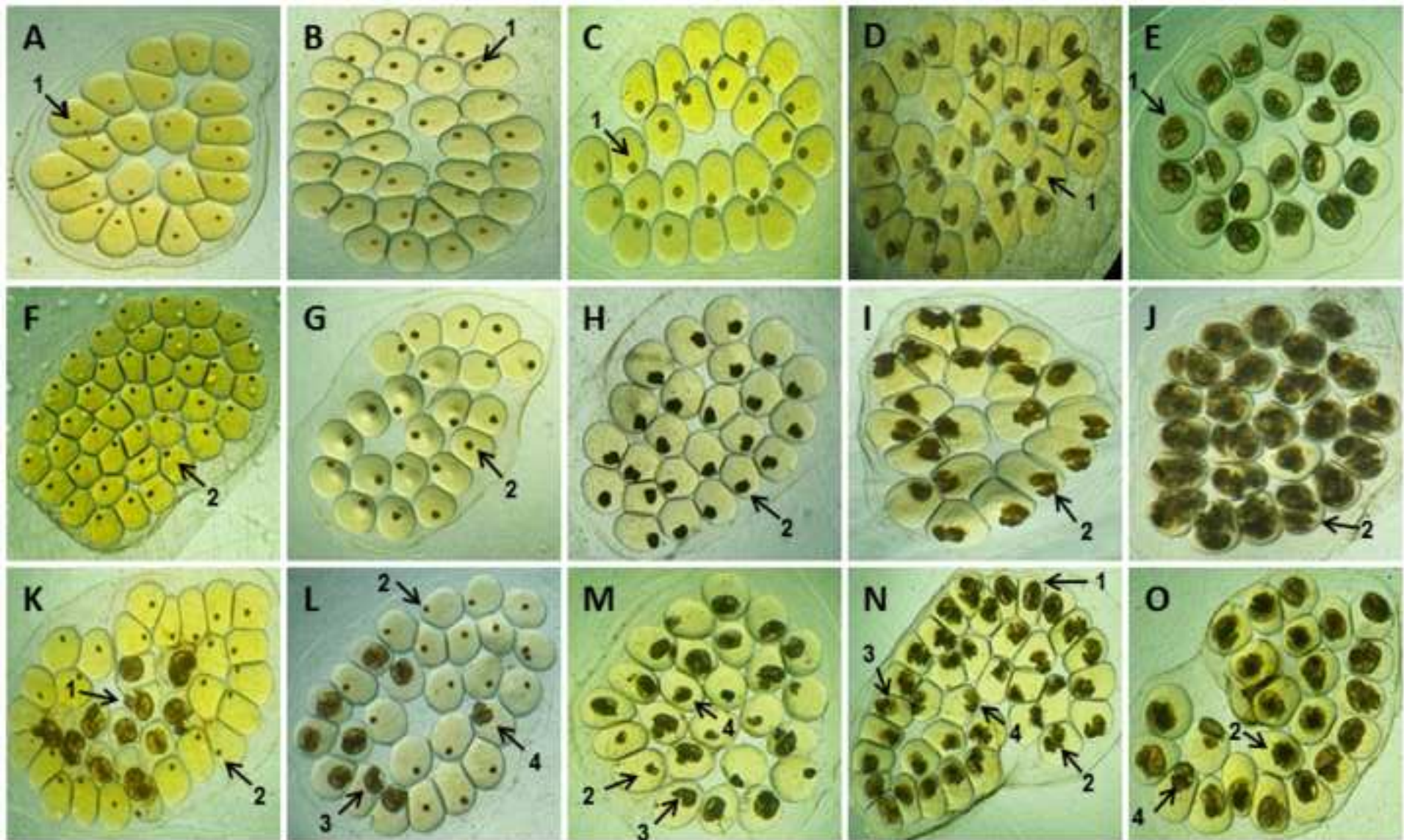
() 95% confidence interval.

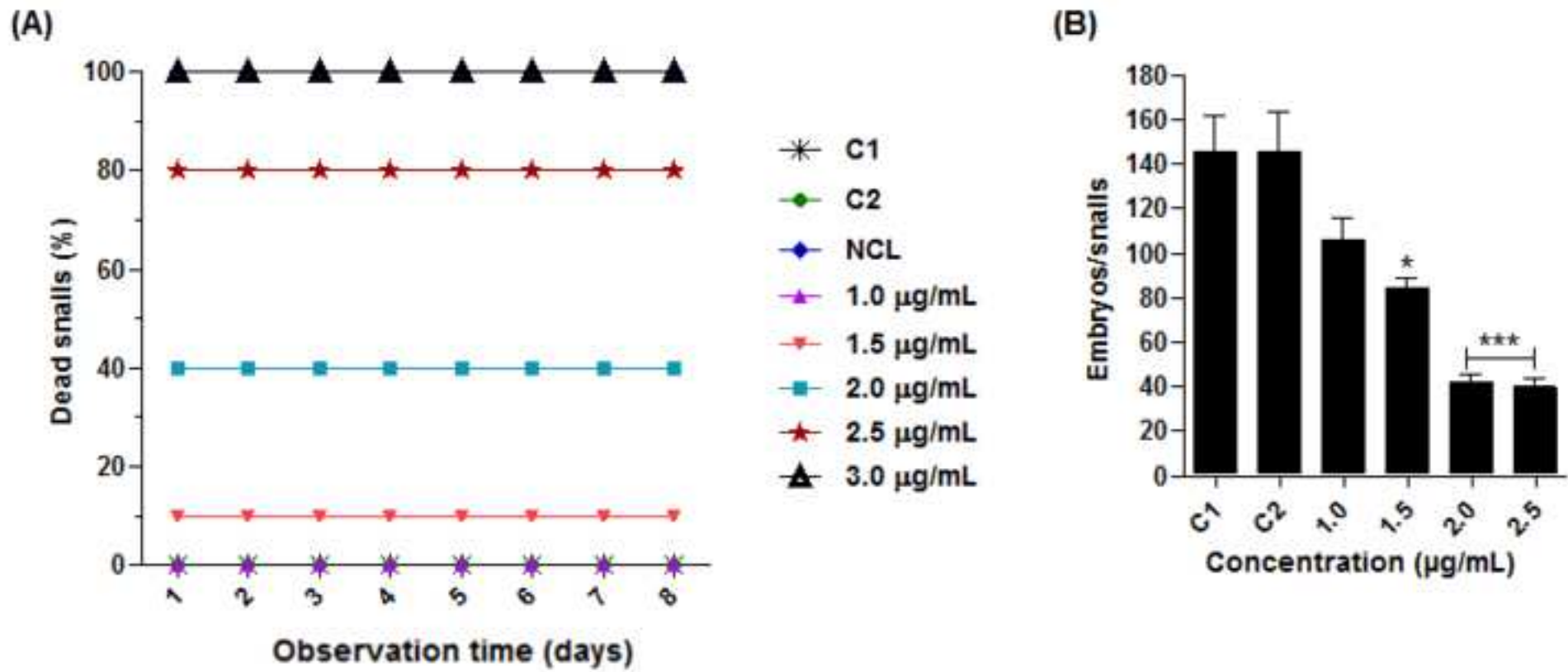
Table 2. Mortality of cercariae of *S. mansoni* exposed to ether extract of *Cladonia substellata*

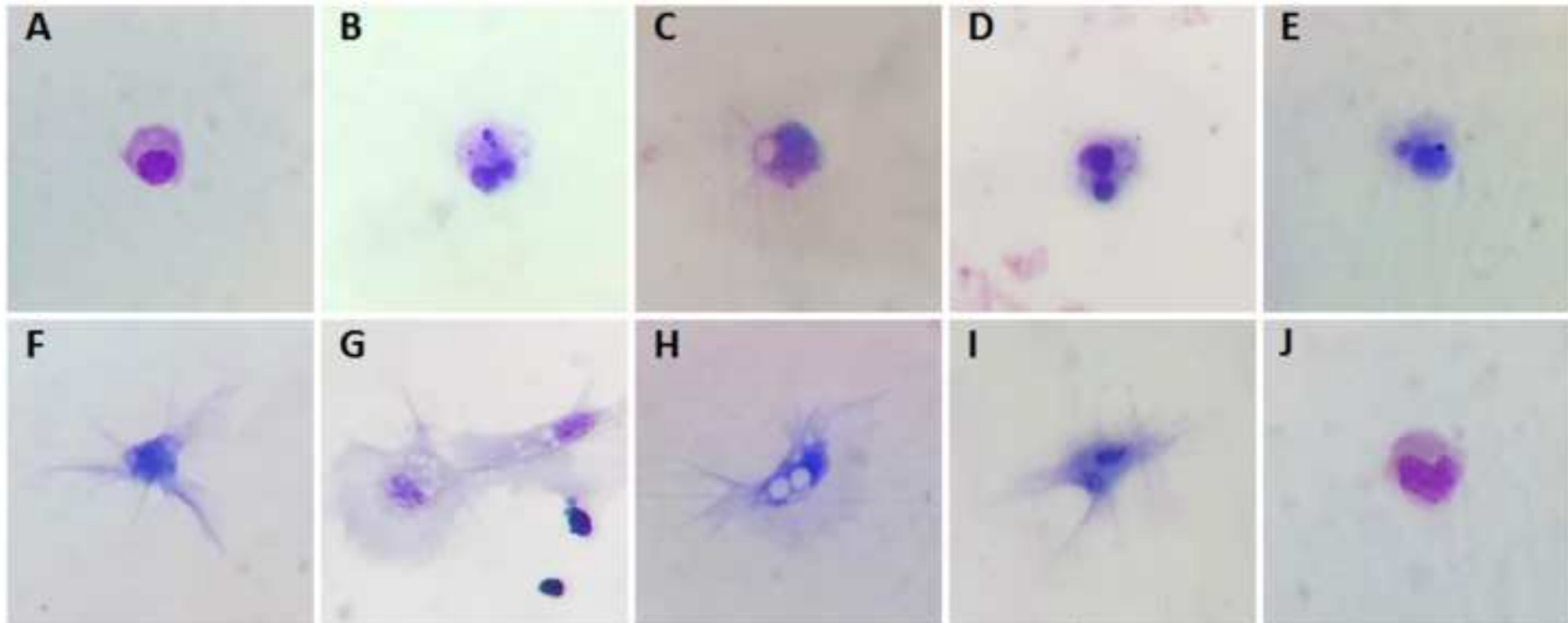
Experimental groups ($\mu\text{g/mL}$)	Exposure time			
	15 min	30 min	60 min	120 min
C1	-	-	-	-
C2	-	-	-	-
NCL	+++	+++	+++	+++
1.0	-	-	-	-
2.5	-	-	-	++
5.0	-	-	++	+++
7.5	-	-	++	+++
10	-	++	++	+++

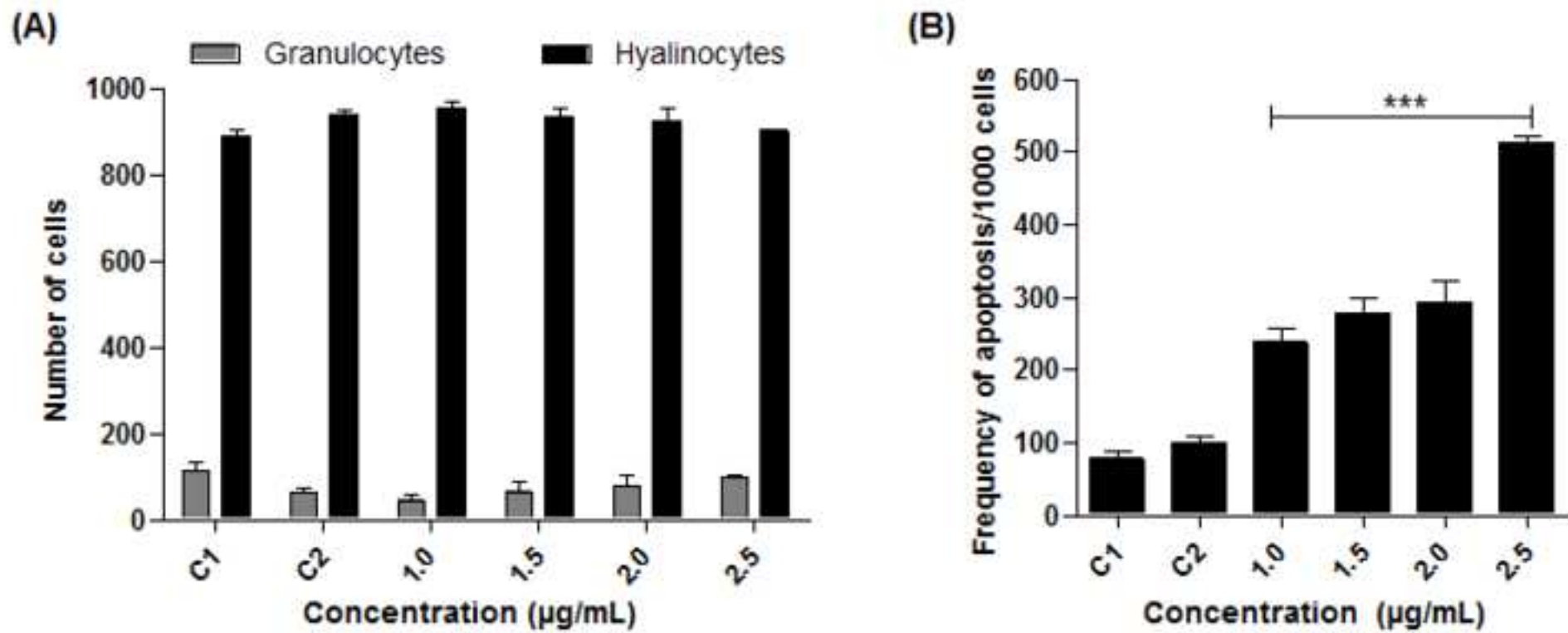
C1: dechlorinated filtered water; C2: 0.5% DMSO + dechlorinated filtered water. NCL: Niclosamide; Lethality of 100% of cercariae (+++); lethality of more than 50% of cercariae (++); lethality of less than 50% of cercariae (+) and no lethality (-).

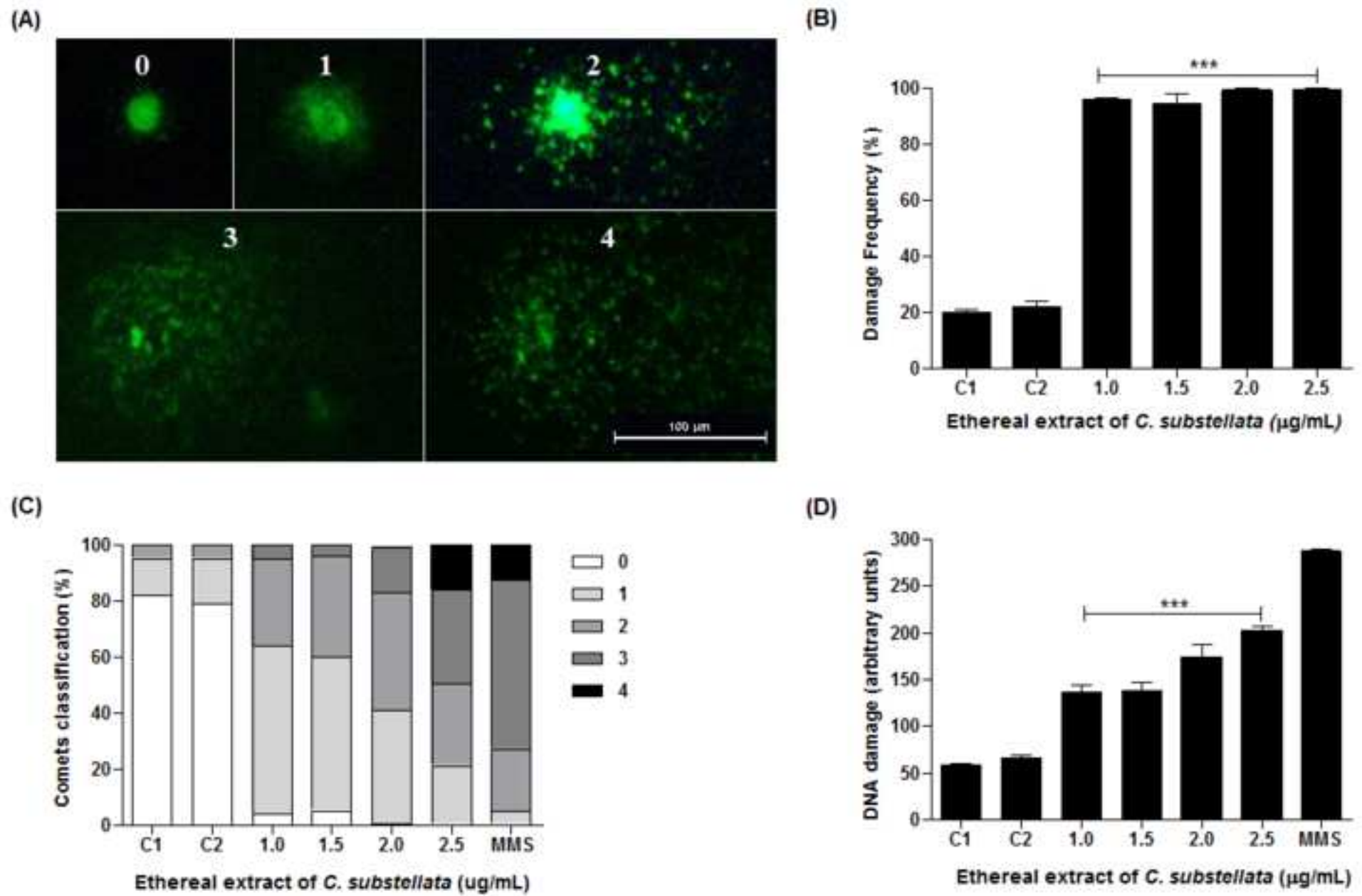


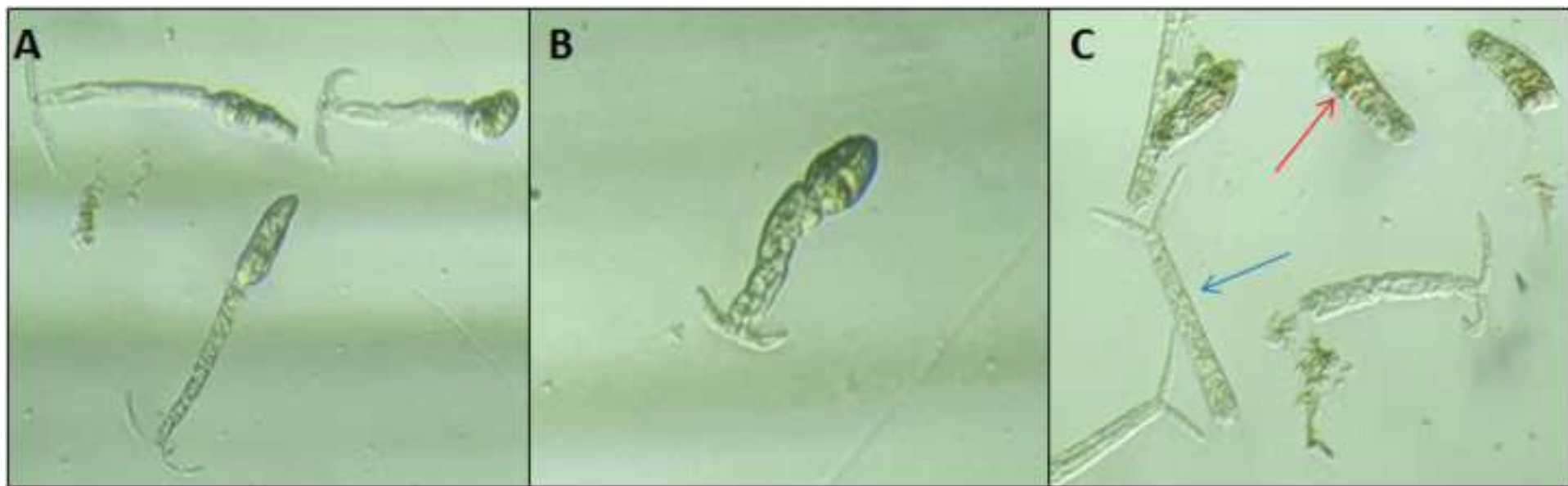


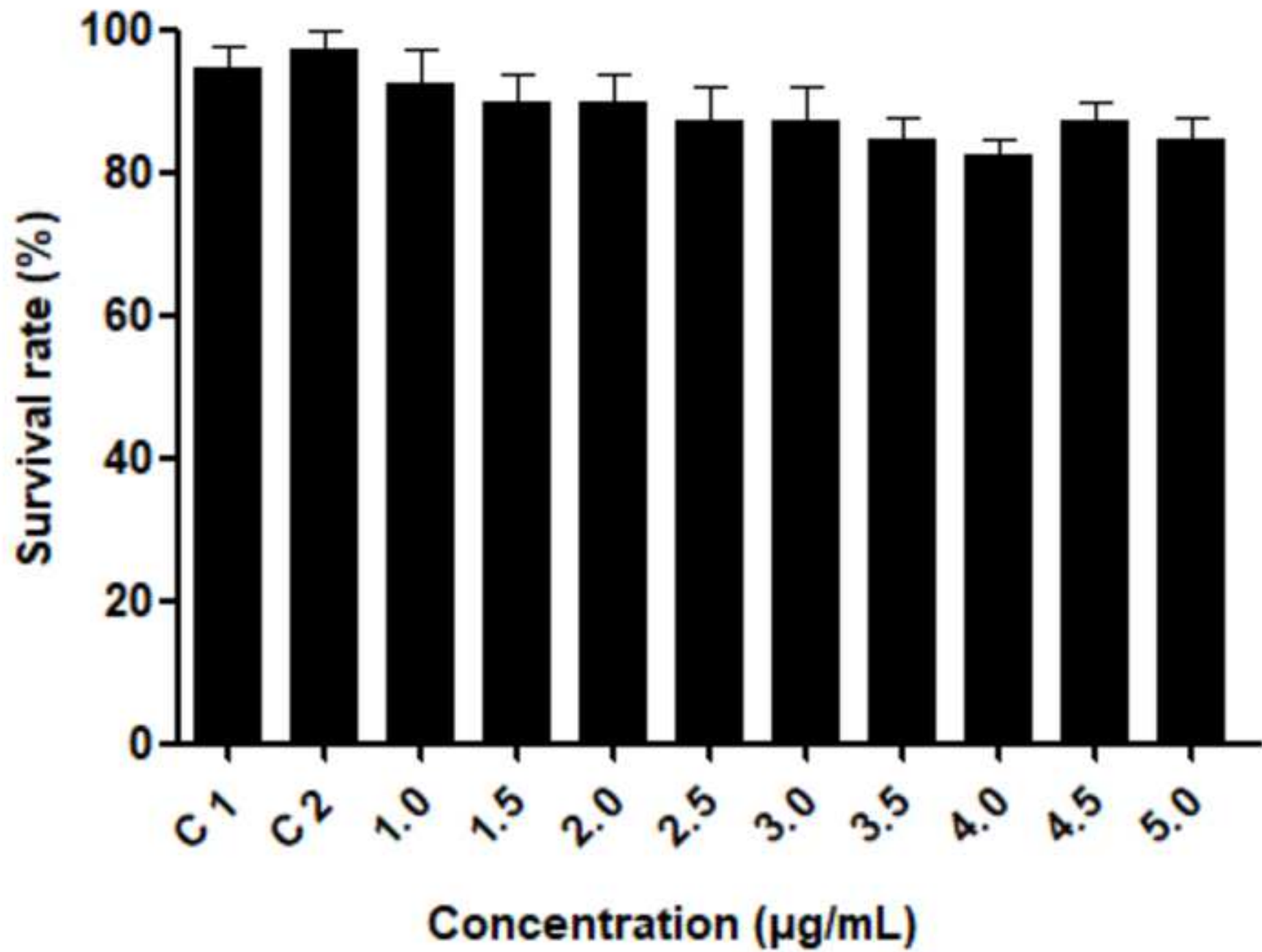












6. CONCLUSÃO

- A composição química do extrato etéreo de *C. substellata* revelou a presença dos ácidos estíptico (4,12%), nortístico (2,14%) e úsnico (92,5%);
- O extrato etéreo de *C. substellata* mostrou atividade embriotóxica contra todos os estádios embrionários de *B. glabrata* (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hippo stage) após 24 horas de exposição;
- Caramujos adultos *B. glabrata* se mostraram suscetíveis ao extrato etéreo de *C. substellata* após 24 horas de exposição. Além disso, os caramujos sobreviventes tiveram a capacidade reprodutiva afetada;
- O extrato etéreo de *C. substellata* causa alterações morfológicas em hemócitos de *B. glabrata*, sobretudo com maior frequência de células com morfologia indicativa de apoptose;
- O extrato etéreo de *C. substellata* causou danos ao DNA dos hemócitos de *B. glabrata*. Os danos encontrados variavam de 0-4;
- O extrato etéreo de *C. substellata* apresenta toxicidade contra cercarias de *S. mansoni*;
- Nenhuma concentração avaliada do extrato etéreo de *C. substellata* exibiu toxicidade sobre *A. salina*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHTI, T. S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brasil. **Tropical Biology**, v. 7, p. 55-77, 1993.
- AHTI, T. **Cladoniaceae**. The Organization for Flora Neotropica. New York Botanical Garden Press, v. 78, n. 1-362, 2000.
- ALBUQUERQUE, L. P. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells and schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALMEIDA, M.R. **Esquistossomose Mansonii no município de Santa Inês/Ba: políticas públicas e fatores associados à prevalência endêmica**. Tese (Doutorado em Planejamento Territorial e Desenvolvimento Social) – Universidade Católica do Salvador - UCSAL, p. 168, 2018.
- ARAÚJO, H. D. A. et al. Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 179, p. 39-43, 2018.
- ARAÚJO, H.D.A. et al. Usnic acid potassium salt: evaluation of the acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. **Molecules**. v. 24, p. 1-17, 2019b.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**. Japan Society from the Promotion of Science, p. 240, 1954.
- ATALABI, T. E.; ADUBI, T. O. The epidemiology and chemotherapeutic approaches to the control of urinary schistosomiasis in school-age children (SAC): a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 73, 2019.
- BAČKOROVÁ, M. et al. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p.462-468, 2012.
- BARBOSA, H. M. S. **Influência do nitrogênio na produção de substâncias degradadoras do milonito por *Cladonia substellata* (líquen)**. Dissertação (Mestrado em Geografia), Universidade Federal de Pernambuco, p. 75, 2009.
- BARBOSA, C. S. et al. Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil. **Revista Ambiente e Agua**, v. 13, n. 3, p. 1, 2018.
- BATTS, J. E.; CALDER, L. J.; BATTS, B.D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. **Chemical Geology**, v. 204, p. 345-368, 2004.
- 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. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, Ed. 2, p. 178, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii : diretrizes técnicas**. [s.l.] Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2016: Informe Técnico**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 23, 2016.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90-98, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2018. Disponível em:

<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acessado em 05/04/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/e/esquistossomose>>.

Acesso em: 8 jan. 2020.

BUGNI, T. S.; ANDJELIC, C. D.; POLE, A. R.; RAI, P.; IRELAND, C. M.; BARROWS, L. R. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. **Fitoterapia**, v. 80, p. 270-273, 2009.

BYEON, H. E. et al. Stereocalpin A inhibits the expression of adhesion molecules in activated bvascular smooth muscle cells. **International Immunopharmacology**, v.12, n. 2, p.315-325, 2012.

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

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 43-84, 2008.

CARVALHO, O. DOS S. et al. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 3, 2018.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHEN, Y. Q. X.; QIONG, M.; LIU, Y. L.; LI, X. R.; YANG, S. L.; ZHUGE, H. X. Laboratory evaluation of the molluscicidal Activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins against the snail *Oncomelania Hupensis*. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 25, p. 224-229, 2012.

CLESSIN, S. **Die Familie der-Limnaeiden enthaltend die Genera Planorbis, Limnaeus, Physa und Amphipeplea**. In MARTINI & CHEMNITZ, Systematisches Conchylien-Cabinet. Nurnberg: Bauer & Raspe, p. 29-430, 1883-1886.

COCCHIETTO, M. et. al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 4, p. 137-146, 2002.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

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

D'ORBINY, A. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per American meridionalem itinere collectorum. **Magazine Zoological**, v. 5, n. 61-62, p. 1-44, 1835.

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

DUNKER, W. Diagnoses specierum novarum generis *Planorbis* collectionis Cumingianae. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 16, p. 40-43, 1848.

EINARSDÓTTIR, E. et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Medica**, v. 76, p. 969-974, 2010.

ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. **Lichen biology**, v. 1, p. 154-180, 1996.

- FACCHINI, L. A. et al. Assessment of a Brazilian public policy intervention to address schistosomiasis in Pernambuco state: The SANAR program, 2011-2014. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.
- FERNÁNDEZ-MORIANO, C., GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P., CRESPO, A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. **Pharm. Biol.** v.54, p. 1,1-17, 2016.
- GAHI. Global Atlas of Helminth Infections. **Global burden**. Disponível em: <<http://www.thiswormyworld.org/worms/global-burden>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- GOWARD, T.; MCCUNE, B.; MEIDINGER, D. **The lichens of British Columbia. Illustrated keys**. Part 1 – Foliose and squamulose species. Ministry of Forests, Research Program, p. 181, 1994.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.
- HÄDER, D.P.; RICHTER, P. **Curso avançado de biologia marinha: experimentos ecofisiológicos**. São Francisco do Sul: Universidade da Região de Joinville, 2009.
- HALE JÚNIOR, M. E. **The biology of lichens**. London: Edward Arnold Pub., Ed. 3, p. 90, 1983.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. **A química dos líquens**. Química Nova, v. 21, n. 6, 1998.
- HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**, v. 86, n. 12, p. 559-570, 1999.
- INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002a.
- INOBAYA, M. et al. Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 2014, n. 5, p. 65-75, 2014.
- JUNG, B.K.; CHAI, J.Y. Epidemiology of Trematode Infections: An Update. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1154, p. 359-409, 2019.
- KAFFER, M. I.; MARTINS, S. M. A. Fungos liquenizados corticolos e terricolos da area da sub-bacia do Sinos e Taquari-Antas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p.815-819, 2005.
- KARABACAK, R. B.; TAY, T.; KIVANC, M. Preparation of novel antimicrobial polymer colloids based on (+)- usnic acid and poly (vinylbenzyl chloride). **Applied Surface Science**, v. 302, p. 262-267, 2014.
- KARIUKI, H. C. *et al.* Long term study on the effect of mollusciciding with niclosamide in stream habitats on the transmission of Schistosomiasis mansoni after community-based chemotherapy in Makueni District, Kenya. **Parasit. Vectors**, v. 6, p.107, 2013.
- KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou, p. 76, 2018.
- KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of Biomphalaria glabrata (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, p. 25-32, 1992.
- KAWANO, T.; WATANABE, L. C.; NAKANO, E.; MEDEIROS, Y.; ARAÚJO, C. M.; CALDEIRA, W. Observation of some key stages of the embryonic development of Biomphalaria straminea (Dunker, 1848) (Mollusca, Planorbidae). **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 46, n. 2-3, p. 85-91, 2004.
- KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C.. **Estudo do desenvolvimento embrionário de Biomphalaria glabrata (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. Schistosoma mansoni e Esquistossomose uma Visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 347-391, 2008.

- KING, C. H.; BERTSCH, D. Historical perspective: snail control to prevent schistosomiasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, p. 4, 2015.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. Oxon : CAB International, Ed. 10, 2008.
- LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2541-2543, 1995.
- LEWIS, F. A.; TUCKER, M. S. **Schistosomiasis**. In: Digenetic Trematodes. Editora Springer, Ed. 1, p. 47-75, 2014.
- LIMA, M. J. G. **Produção do ácido úsnico de Cladonia substellata vainio (líquen) por imobilização celular, utilizando diferentes métodos**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco – Recife, p. 63, 2004.
- LIRA, S. P. de. **Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos Isolados de esponjas Marinhas e do fungo Beauveria felina de Origem Marinha**. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica), Instituto de Química, Universidade de São Paulo - São Carlos, p. 149, 2007.
- LOYO, R.M. **Avaliação do Perfil Metabolômico da Esquistossomose Mansônica em Modelo Animal**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
- LUCKING, R.; SIPMAN, H. J. M.; TENORIO, L. U. **Guía para géneros de líquenes tropicales**. Ticolichen - The Costa Rican Lichen Biodiversity Inventory. Field Museum, 2004.
- LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **J. Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.
- LUZ, J. S. B. *et al.* Ultrastructural analysis of Leishmania infantum chagasi promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. **Sci world J.**, v. 25, p. 1-7, 2015.
- MARTINS, M. C. B. **Aplicações Biotecnológicas de compostos obtidos dos Líquens**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2013.
- MARTINS, M. C. B. *et al.* Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of Biomphalaria glabrata (Say, 1818). **Plos one**, v.9, p. 1-6, 2014.
- MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, 2018.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- MIYASATO, P. A.; KAWANO, T.; FREITAS, J. C.; BERLINCK, R. G. S.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. Molluscicidal activity of some marine substance against the snail Biomphalaria glabrata (Mollusca, Planorbidae). **Parasitol. Res.**, v. 110, p. 1873-1879, 2012.
- MOEL, R. S. P. **Líquenes**. Portugal: Ed. Vertigem, p. 27, 2008.
- MORAES, V. S. *et al.* Diagnosis of schistosoma mansoni infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180478, 2019.
- MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 9-16, 2001.

- NASH III, T.H. Introduction. In: _____. (ed) **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University, p. 1-7, 1996.
- NASH, T. H. III. **Lichen Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 498, 2008.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. Editora Atheneu, Ed. 13, p. 616, 2016.
- NOYA, O. et al. **Schistosomiasis in America**. In: FRANCO-PAREDES, C.; SANTOS-PRECIADO, J. (Eds.). Springer-Verlag Wien, Ed, 1, p. 11-43, 2015.
- NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the Genus *Artemia* in Ecotoxicity Testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.
- NUNES, P. S. et. al. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, 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.
- OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<https://paho.org/en/topics/schistosomiasis>> Acesso em: 10 Jan. 2021.
- ÖZVAN, A.; DİNÇER, I.; AKIN, M.; OYAN, V.; TAPAN, M.. Experimental studies on ignimbrite and the effect of lichens and capillarity on the deterioration of Seljuk Gravestones. **Engineering Geology**. v.185, p. 81-95, 2015.
- PARAENSE, W. L. & DESLANDES, N. *Australorbis intermedius* sp. n. from Brazil (Pulmonata, Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 12, n. 4, p. 343-350, 1962.
- PARAENSE, W. L. *Biomphalaria amazonica* and , two new species of neotropical planorbid mollusks B. cousin. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, n. 2, p. 115-126, 1966.
- PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional**, v. 55, p. 105-128, 1975.
- PARAENSE, W. L. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 2, p. 199-211, 1981.
- PARAENSE, W. L. *Biomphalaria Tenagophila Guaibensis* ssp. n. from Southern Brazil and Uruguay (pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, 1984.
- PARAENSE W. L. **Distribuição dos caramujos no Brasil**. In: REIS, F. A.; FARIA, I.; KATZ, N. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina, v. 1, p.117-128, 1986.
- PARAENSE, W. L. **Histórico do gênero biomphalaria, morfologia e sistemática morfológica**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L., orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 284-308, 2008.
- PEREIRA, E. C. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de Cladonia e Cladina (líquen)**. Dissertação do Curso de Mestrado em Criptógamos. Departamento de Micologia, Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco, p. 193, 1989.
- PEREIRA, E. C. **Biologia de líquens**. Recife: Núcleo de Estudos do Meio Ambiente (NEMA/UFPE), p. 31, 2002.
- PERNAMBUCO, Secretaria Estadual de Saúde. **Boletim esquistossomose 2017**. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, 2018.

- PIERI, O.; FAVRE, T. C.; BARBOSA, C. S.; LEAL-NETO, O. B.. **Os moluscos transmissores e outros moluscos de importância médica**. In: BARBOSA, C. S.; GOMES, E. C.; LEAL NETO, O. Manual prático para diagnóstico e controle da esquistossomose. Recife: Editora Universitária, Ed. 2, p. 31-51, 2012.
- PROCÓPIO, T. F. et al. Schinus terebinthifolius leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v. 10, n. 5, 2015.
- PURVIS, O.W. **Lichens**. London: The Natural History Museum, Ed. 1, p. 112, 2000.
- ROCHA-FILHO, C. A. A. et al. Assessment of toxicity of *Moringa oleífera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 132, p. 188-192, 2015.
- RUSSO, A.; CAGGIA, S.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; CARDILE, V. Effects of vicinidin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. **Chem. Biol. Interact**, v. 195, p. 1-10, 2012.
- SAHIN, S. et al. Ramalina lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Food Biochemistry**, v.39, p.471-477, 2015.
- SAY, T. Account of two new genera, and several new species, of fresh water and land shells. **Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 1, n. 2, p. 276-284, 1818.
- SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-lting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2492, 2018.
- SEAWARD, M. R. D. **Lichen Ecology**. London: Academic Press, p. 550, 1977.
- SHIBATA, S.; UKITA, T. et al. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. **Japanese Journal of Medicine**, v. 1, n. 2, p. 152-155, 1948.
- SILVA, H. P. B. **Influência da temperatura na ação quelante do ácido úsnico, e avaliação do comportamento do talo in natura de *Cladonia substellata* sobre granito e calcário da Região Metropolitana do Recife-PE**. Monografia de Bacharelado em Geografia, Universidade Federal de Pernambuco - Recife, PE, p. 54, 2005.
- SILVA, H. P. B. **Radiossensibilidade gama de *Cladonia substellata* Vainio (líquen) e o consequente efeito sobre rochas calcárias**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CTG, Tecnologias Energéticas e Nucleares, p. 45, 2006.
- SILVA, H. A. M. F. et al. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta Tropica**, v. 196, p. 172-179, 2019.
- SILVA-MORAES, V. et al. Serological proteomic screening and evaluation of a recombinant egg antigen for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infections in endemic area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0006974, 2019.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *artemia salina* leach. **Química nova**, v. 21, n. 5, 1998.
- SISPCE/SVS/MS. Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. **Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de positividade, por município**. Brasil, 2009-2017. 2018.

- SOARES, J. F. et. al. Absorção de chumbo antrópico por populações de líquens do gênero *Usnea* em área industrial. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 5, p. 3831-3836, 2014.
- SPIELMANN, A. A.; MARCELLI, M. P. **Fungos liquenizados (líquens)**. Instituto de Botânica. Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Programa de capacitação de monitores e educadores. São Paulo, 2006.
- VASCONCELOS, T. L.; SILVA, A. K. O.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. The lichen *Cladonia verticillaris* retains and modifies mineral soil particles. **Catena**, v. 135, p. 70-77, 2015.
- VICENTE, C. **Fisiologia de las sustancias líquénicas**. Madrid: Alhambra, Ed. 1, p. 161, 1975.
- WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. CRC Press, Ed. 4, p. 386, 2012.
- WEIDEBORG, M.; VIK, E. A.; OFJORD, G. D.; KJONNO, O. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. **Environmental Technology and Chemistry**, v. 16, p. 384-389, 1997.
- WHO. World Health Organization. **Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plants molluscicides**. Geneva, 1983.
- WHO. World Health Organization. **The control of schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee**. Geneva, 1993.
- WHO, World Health Organization. **Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers**. Geneva, Switzerland, 2017.
- WHO. World Health Organization. **Schistosomiasis**. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: 02/12/2020.
- WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain progress, 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress>. Acesso em: 22/12/2020.
- WILL-WOLF et al. **Lichenized Fungi**. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (eds.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, p. 173-195, 2004.
- XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 619, 2006.
- ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia e desenvolvimento sustentável: Perspectivas para o século XXI**, in **VI Encontro de Ecotoxicologia**. São Carlos, SP: Mini Curso: ecotoxicologia Aquática, 2000.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Editora Rima, p. 478, 2006.
- ZOONAR. **Artemia salina**. Fotografia, colorida. Disponível em: https://www.zoonar.de/photo/salzkrebs-artemia-salina_2483057.html. Acesso em: 18 mai. 2021.

Anexo 1

Your PDF has been built and requires approval

3 mensagens

Industrial Crops and Products <em@editorialmanager.com>

8 de março de 2022 18:18

Responder a: Industrial Crops and Products <support@elsevier.com>

Para: André de Lima Aires <andre.laires@ufpe.br>

Industrial Crops & Products

Title: *Cladonia substellata* (Lichen) extract: Toxicological, cytotoxic and genotoxic effects on the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni cercariae*

Authors: João Victor Ritinto da Rocha; Thierry Wesley de Aguiar Albuquerque; Dewson Rocha Pereira; Nicácio Henrique da Silva; Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque; Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho; Hianna Arely Milca Fagundes Silva; Hallysson Douglas Andrade de Araújo; André de Lima Aires

Dear Ph.D André de Lima Aires,

The PDF for your submission, "*Cladonia substellata* (Lichen) extract: Toxicological, cytotoxic and genotoxic effects on the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni cercariae*" has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to the Editorial Manager as an Author:

<https://www.editorialmanager.com/indcro/>

Your username is: andre.laires@ufpe.br

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

You will also need to confirm that you have read and agree with the Elsevier Ethics in Publishing statement before the submission process can be completed. Once all of the above steps are done, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission from the Editorial Office. For further information or if you have trouble completing these steps please go to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no change can be made after approving a submission. If you have any trouble with the generated PDF or completing these steps please go to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Your submission will be given a reference number once an Editor has been assigned to handle it.

Thank you for your time and patience.

Kind regards,

Editorial Office

Industrial Crops & Products

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

#AU_INDCRO#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/indcro/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.