

GUILHERME SENNA DOS SANTOS

Avaliação da atividade moluscicida e cercaricida da alga marinha *Laurencia dendroidea* (Rhodophyta, Ceramiales).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2020

GUILHERME SENNA DOS SANTOS

**Avaliação da atividade moluscicida e cercaricida da alga marinha *Laurencia dendroidea*
(Rhodophyta, Ceramiales).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Eliana Nakano

Co-orientadora: Dra Erika Mattos Stein

Versão original.

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Senna dos Santos, Guilherme
Avaliação da atividade moluscicida e cercaricida
da alga marinha *Laurencia dendroidea* (Rhodophyta,
Ceramiales) / Guilherme Senna dos Santos;
orientadora Eliana Nakano; coorientadora Erika
Mattos Stein. -- São Paulo, 2020.
95 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Parasitologia. 2. Esquistossomose. 3.
Biotecnologia. I. Nakano, Eliana, orientador. II.
Mattos Stein, Erika, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Guilherme Senna dos Santos

Titulo da Dissertação: Avaliação da atividade moluscicida e cercaricida da alga marinha
Laurencia dendroidea (Rhodophyta, Ceramiales)

Orientador: Eliana Nakano

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni* em laboratório - antigo 1392/15", protocolada sob o CEUA nº 3974190718, sob a responsabilidade de **Eliana Nakano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 07/08/2018.

We certify that the proposal "Maintenance of *Schistosoma mansoni* cycle in laboratory", utilizing 144 Hamsters (144 females), protocol number CEUA 3974190718, under the responsibility of **Eliana Nakano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 08/07/2018.

Finalidade da Proposta: Manutenção

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 08/2021 Área: Parasitologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Hamsters

sexo: Fêmeas

idade: 21 a 23 dias

N: 144

Linhagem: Sírio Dourado

Peso: 20 a 40 g

Resumo: Conforme aprovado anteriormente pela CEUAIB: A esquistossomose é uma doença endêmica causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* que afeta mais de 240 milhões de pessoas no mundo, a maioria na África subsaariana. O Brasil apresenta quase 7 milhões de infectados, com 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas. Apesar disso, o tratamento e o controle da esquistossomose é limitado a um único composto, o praziquantel. Este fármaco, entretanto, não é ativo contra vermes jovens e não previne a reinfecção. A resistência ainda não foi observada clinicamente, mas já foi relatada a ocorrência de parasitas menos suscetíveis ao fármaco em laboratório. Produtos naturais podem ser uma alternativa, fornecendo compostos líderes para o desenvolvimento de agentes bioativos. O Laboratório de Parasitologia tem mantido o ciclo do *Schistosoma mansoni* principalmente para a realização de estudos de bioprospecção de compostos esquistossomicidas. Nosso grupo trabalha também trabalha em colaboração com o Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose. Cultivos de trematódeos são mantidos em poucos laboratórios devido, principalmente, a seus ciclos de vida complexos que requerem, pelo menos, dois hospedeiros, um vertebrado e um molusco? ainda, a manutenção do ciclo inteiro de trematódeos in vitro não é possível. No nosso laboratório, o ciclo é mantido em hamsters e caramujos *Biomphalaria glabrata*.

Local do experimento: Conforme aprovado anteriormente pela CEUAIB: Laboratório de Parasitologia

São Paulo, 13 de agosto de 2018

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Eliana Nakano pelo conhecimento passado e pela oportunidade de integrar a equipe do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

À Dr^a. Erika Mattos Stein, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas da USP, pela orientação nas práticas de fracionamento e identificação dos compostos deste estudo.

Aos Profs. Drs. Pedro Ismael da Silva Júnior, Márcia Regina Franzolin e Claudia Maria Furlan pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Pio Colepico e a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas da USP, pelo uso das dependências, equipamentos e reagentes do laboratório, além de auxílios e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Ivone Borrely, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela parceria nos testes toxicológicos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira do Instituto de Matemática e Estatística da USP pela realização das análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia: Sara, Giovana, Rafaela, Lenita e Alexsander, por tornar o dia a dia no laboratório mais divertido; e especialmente a Patricia, que foi essencial no desenvolvimento deste trabalho ao auxiliar nos testes de atividade cercaricida.

Aos meus amigos Félix, Amanda, Matheus, Eduardo, Victor e Lucas, que sempre estiveram presentes, mesmo com a distância, iluminando até os meus dias mais escuros.

Aos meus amigos Daniel, Luana e Diana, por darem mais cor à vida em São Paulo.

À minha mãe e vó, pelo suporte e por aguentar a saudade da distância para que eu pudesse concluir essa etapa.

À família Castanharo, pela amizade, moradia e pela pessoa que me trouxe até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da USP, a própria Universidade de São Paulo e ao Instituto Butantan, pelas condições fornecidas para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, sob processo 130579/2017-3.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

SANTOS, G. S. **Avaliação da atividade moluscicida e cercaricidade da alga marinha *Laurencia dendroidea* (Rhodophyta, Ceramiales)**. 2020. 96. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A esquistossomose, doença parasitária causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, afeta cerca de 258 milhões de pessoas no mundo todo; aproximadamente 650 milhões estão sujeitas à infecção por viverem em áreas endêmicas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um controle integrado visando o tratamento de doentes e eliminação do hospedeiro intermediário (planorbídeos do gênero *Biomphalaria*) para a redução na transmissão da doença. Entretanto, a niclosamida é único composto sintético disponível comercialmente utilizado no controle do hospedeiro intermediário e o tratamento dos doentes se restringe a um único fármaco, o praziquantel. Desse modo, a busca por novos compostos moluscicidas e esquistossomicidas tem se intensificado como alternativa aos existentes. Neste trabalho, através do fracionamento biomonitorado de extratos de *Laurencia dendroidea*, foi isolado um composto ativo em embriões de *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*, em concentrações abaixo da recomendada pela OMS. Após caracterização por CG-EM e RMN, o composto ativo foi identificado como elatol. As atividades moluscicida e cercaricida do obtusol e iso-obtusol, análogos do elatol isolados de *L. dendroidea* em estudo anterior, foram comparativamente testadas. A toxicidade dos três compostos análogos foi testada em *D. similis*, onde todos foram considerados tóxicos. Derivados desses compostos estão em desenvolvimento, a fim de elucidar os mecanismos de ação e diminuir a toxicidade a organismos não alvo. Além disso, o presente estudo propôs-se a aperfeiçoar a metodologia de fracionamento biomonitorado ao adicionar metodologias aplicadas a estudos metabolômicos, denotando 20 regiões de tempos de retenção que apresentam compostos com atividade em potencial.

Palavras-chave: esquistossomose, caramujo, terpenos, atividade biológica.

ABSTRACT

SANTOS, G. S. **Evaluation of the molluscicidal and cercaricidal activity from the marine algae *Laurencia dendroidea* (Rhodophyta, Ceramiales)**. 2020. 96. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Schistosomiasis, a parasitic disease caused by helminth trematodes of the genus *Schistosoma*, affects about 258 million people worldwide; approximately 650 million are subject to infection because they live in endemic areas. The World Health Organization (WHO) recommends an integrated control aimed at the treatment of patients and elimination of the intermediate host (planorbidae of the genus *Biomphalaria*) for the reduction in the transmission of the disease. However, niclosamide is the only commercially available synthetic compound used in the control of the intermediate host and the treatment of the patients is restricted to a single drug, praziquantel. Thus, the search for new molluscicidal and schistosomicidal compounds has intensified as an alternative to existing ones. In this work through biomonitored fractioning of *Laurencia dendroidea* extracts, an active compound on *Biomphalaria glabrata* embryos and *Schistosoma mansoni* cercarie was isolated, on concentrations bellow that recommended by the WHO. After characterization by GC-MS and MNR, the compound was identified as elatol. The molluscicidal and cercaricidal activities of obtusol and iso-obtusol, elatol analogous compounds, isolated from *L. dendroidea* on a previous study, were tested comparatively. The toxicity of the three analogous compounds was tested on *D. similis*, where all were considered toxic. Derivatives from these compounds are in development, to elucidate the mechanisms of action and lower the toxicity to non-target organisms. Furthermore, the present study proposed to improve the biomonitored fractioning methodology by adding metabolomics studies applied methodology, denoting twenty regions with retention times that present compounds with potential biological activity.

Keywords: schistosomiasis, snail, terpenes, biological activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição da esquistossomose mansoni, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2012. Fonte: Portal da Saúde/ Ministério da Saúde.	15
Figura 2: Fases de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i> : A-ovo, B-miracídio, C-cercaria, D-vermes adultos, fêmea no canal ginecórico do macho para acasalamento (BRASIL, 2014).	16
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> . Adaptado de: Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html	17
Figura 4: Distribuição espacial de <i>B. glabrata</i> no Brasil (CARVALHO; CALDEIRA, 2004)	18
Figura 5: <i>Biomphalaria glabrata</i> . A- adulto. B- desovas com 21 embriões: 1- cápsula, 2- embrião e 3-membrana do ovo. Foto: Ludmila Nakamura Rapado.	19
Figura 6: Estágios embrionários de <i>Biomphalaria glabrata</i> A- blástula, B- gástrula, C - trocófora, D- véliger e E- hipoestádio (pré-eclosão). Foto: Ludmila Nakamura Rapado	19
Figura 7: Descrição química e molecular do praziquantel.....	21
Figura 8: Descrição química e molecular da niclosamida.....	22
Figura 9: Exemplos de diferentes classes de metabólitos produzidos pelas espécies do gênero <i>Laurencia</i> . Modificado de: WANKE, 2014.	27
Figura 10: Exemplar da amostra da espécie <i>Laurencia dendroidea</i> no habitat natural na Praia dos Castelhanos, litoral do Espírito Santo (A). Aspecto geral do talo (B). Detalhe do ramo (C). Fotos: Erika Mattos Stein (STEIN, 2015).	28
Figura 11: Fluxo de passos para análise metabolômica por espectrometria de massas. Adaptado de (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006).	31
Figura 12: Localização do ponto de coleta da macroalga marinha vermelha <i>L. dendroidea</i> utilizada no projeto.	35
Figura 13: Sistema fechado para criação de caramujo <i>B. glabrata</i> do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.	37
Figura 14: Cromatograma do extrato em éter de petróleo de <i>L. dendroidea</i> obtido por CG-EM.	44
Figura 15: Cromatograma do extrato em diclorometano de <i>L. dendroidea</i> obtido por CG-EM.	44
Figura 16: Cromatograma do extrato em metanol de <i>L. dendroidea</i> obtido por CG-EM.....	45

Figura 17: Fluxograma de fracionamento do extrato em diclorometano de <i>L. dendroidea</i> biomonitorado pela atividade moluscicida em <i>B. glabrata</i>	47
Figura 18: Fluxograma de fracionamento do extrato em diclorometano de <i>L. dendroidea</i> biomonitorado pela atividade cercaricida em <i>S. mansoni</i>	49
Figura 19: Espectro de RMN de ¹³ C (CDC1 ₃ , 500 MHz) da substância isolada.....	50
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H (CDC1 ₃ , 500 MHz) da substância isolada.....	51
Figura 21: Espectro de RMN de HSQC (CDCL ₃ , 400 MHz) da substância isolada.....	51
Figura 22: Espectro de RMN de HMBC (CDC1 ₃ , 500 MHz) da substância isolada.....	52
Figura 23: Estrutura química do elatol.....	53
Figura 24: Relação entre os níveis de atividade moluscicida e os diferentes compostos denotados pelo par m/z/TR. Denotadas em vermelho estão regiões com pares m/z/TR com possibilidade de serem compostos responsáveis pela atividade biológica.....	56
Figura 25: Curva dose-resposta de sobrevivência de embriões de <i>B. glabrata</i> em estágio véliger expostos ao elatol.....	59
Figura 26: Curva dose-resposta de sobrevivência de embriões de <i>B. glabrata</i> em estágio blástula expostos ao elatol.....	60
Figura 27: Cercárias de <i>S. mansoni</i> : (A) indivíduo do grupo controle em meio aquoso; (B) cabeça do indivíduo exposto a elatol na concentração de 25 mg.L ⁻¹ . Imagens obtidas em microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss).....	61
Figura 28: Cabeça da cercária de <i>S. mansoni</i> exposta a (A) iso-obtusol e (B) obtusol na concentração de 25 mg.L ⁻¹ . Imagem obtida em microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do ensaio de toxicidade dos extratos brutos de <i>Laurencia dendroidea</i> (LD) com base no número de animais mortos após 7 dias de exposição.	43
Tabela 2: Frações obtidas após fracionamento em coluna aberta do extrato de LD em diclorometano e suas respectivas massas.	48
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ em ppm) e ^1H (δ em ppm, multiplicidade J em Hz) do elatol (em CDCl_3 , 400 MHz) e comparação com a literatura.....	54
Tabela 4: Atividade moluscicida em embriões em diferentes estádios de <i>B. glabrata</i> de elatol isolado de <i>L. dendroidea</i>	58
Tabela 5: Valores das concentrações letais a 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) dos indivíduos de <i>B.glabrata</i> em estádios embrionários expostos ao elatol.	59
Tabela 6: Mortalidade de <i>Daphnia similis</i> expostas a elatol isolado no presente estudo e dados de niclosamida da literatura.....	62
Tabela 7: Atividade moluscicida do obtusol e iso-obtusol em embriões em diferentes estádios de desenvolvimento de <i>B. glabrata</i>	62
Tabela 8: Mortalidade de <i>Daphnia similis</i> expostas a obtusol, iso-obtusol e niclosamida.	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI.....	14
1.1.1 Ciclo de vida.....	15
1.1.1.1 <i>Hospedeiro intermediário.....</i>	17
1.2 HISTÓRICO DE CONTROLE.....	19
1.3 POTENCIAIS ALTERNATIVAS.....	23
1.3.1 Algas marinhas.....	24
1.3.1.1 <i>Gênero Laurencia.....</i>	26
1.3.1.1.1 <i>Laurencia dendroidea.....</i>	28
1.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE MOLUSCICIDA E CERCARICIDA EM <i>LAURENCIA DENDROIDEA</i>	29
1.4.1 Métodos para identificação de compostos com atividade moluscicida e cercaricida.....	29
1.4.2 Caracterização de compostos com atividade moluscicida e cercaricida.....	31
1.5 COMPOSTOS ANÁLOGOS.....	32
1.6 EPÍLOGO.....	33
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 GERAL.....	34
2.2 ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO VEGETAL.....	35
3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	36
3.3 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS CARAMUJOS.....	36
3.4 FRACIONAMENTO BIOMONITORADO.....	37
3.4.1 Avaliação da atividade moluscicida.....	37
3.4.2 Avaliação da atividade cercaricida.....	38
3.4.3 Avaliação das atividades moluscicidas e cercaricidas de compostos análogos.....	38
3.4.4 Análises químicas.....	38
3.4.4.1 <i>Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.....</i>	39
3.4.4.2 <i>Cromatografia em camada delgada.....</i>	40

3.4.4.3	<i>Cromatografia líquida em coluna (CLC) sob pressão ambiente</i>	40
3.4.4.4	<i>Identificação estrutural dos compostos ativos</i>	41
3.5	ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS DE CG-EM.....	41
3.6	ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	41
3.7	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	42
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	43
4.2	ATIVIDADE MOLUSCICIDA DOS EXTRATOS BRUTOS.....	43
4.3	PERFIL CROMATOGRÁFICO (FINGERPRINT) DOS EXTRATOS BRUTOS POR CG-EM E CCD.....	44
4.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO.....	46
4.4.1	FRAÇÕES DO EXTRATO EM DICLOROMETANO	46
4.4.1.1	<i>Atividade moluscicida das frações LD-DCM</i>	46
4.4.1.2	<i>Atividade cercaricida das frações LD-DCM</i>	49
4.4.1.3	<i>Identificação do composto ativo</i>	49
4.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MOLUSCICIDA, CERCARICIDA E DA TOXICIDADE DO ELATOL.....	57
4.5.1	Atividade moluscicida do elatol em embriões de <i>B. glabrata</i>	57
4.5.2	Atividade cercaricida do elatol em cercarias de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	60
4.5.3	Avaliação da toxicidade do elatol	61
4.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MOLUSCICIDA, CERCARICIDA E DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS ANÁLOGOS DO ELATOL.....	62
4.6.1	Atividade moluscicida do obtusol e iso-obtusol	62
4.6.2	Atividade cercaricida do obtusol e do iso-obtusol	63
4.6.3	Toxicidade do obtusol e iso-obtusol	63
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	70
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
	BIBLIOGRAFIA	72
	ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose mansoni, doença parasitária causada por vermes trematódeos digenéticos *Schistosoma mansoni*, é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2016). A patologia afeta países tropicais os quais possuem não só fatores climáticos favoráveis (CAMARGO, 2008), mas também forte componente de subdesenvolvimento, pobreza e negligência na saúde pública (BRUUN *et al.*, 2008).

Atualmente, dos 78 países endêmicos em esquistossomose, 54 apresentam infecção por esquistossomose mansoni, estando esses localizados principalmente na África, Leste Mediterrâneo, regiões do Delta do Nilo e nas Américas (MS, 2016; WHO, 2016). Na América, Brasil, Venezuela, Suriname e Santa Lucia estão entre os países com alto índice de endemicidade, sendo os dois primeiros os que mais merecem atenção dos sistemas de saúde pública (PAHO, 2014).

O Brasil é o país com maior área endêmica devido à migração de pessoas infectadas para áreas até então indenes em busca de melhores condições de vida, contribuindo para a dispersão da doença. Detectada pela primeira vez no estado da Bahia em 1908, hoje afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas pelo país (Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em, 2014). Atualmente, os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados, compreendendo principalmente toda a faixa litorânea do sul do Espírito Santo até o Maranhão, e o interior de Minas Gerais e Bahia (MS, 2016). A Figura 1 apresenta o mapa de distribuição da esquistossomose mansoni de acordo com a faixa de positividade no ano de 2012.

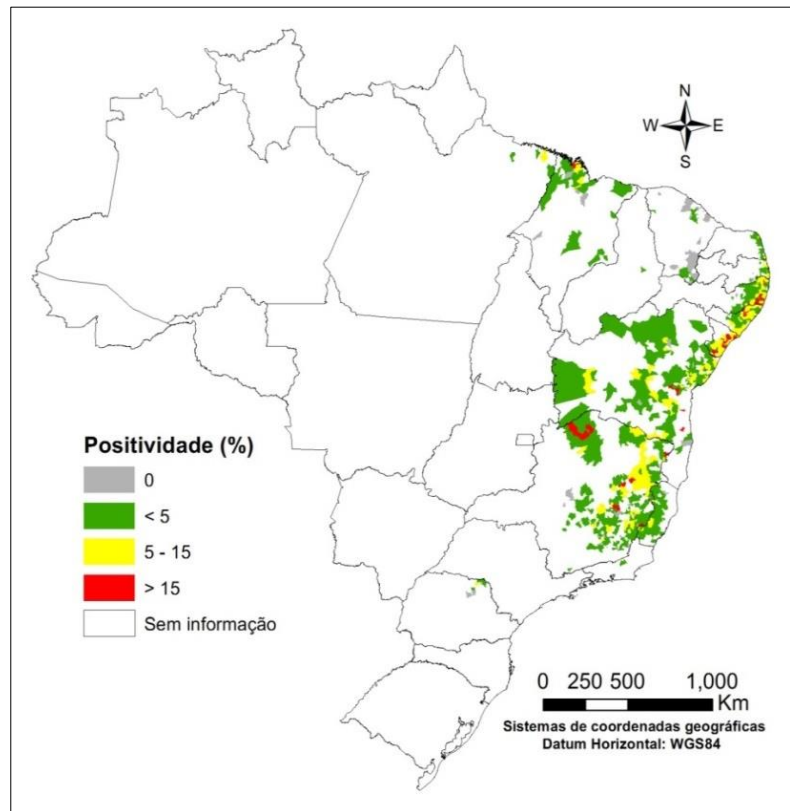


Figura 1: Distribuição da esquistossomose mansoni, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2012. Fonte: Portal da Saúde/ Ministério da Saúde.

A patologia se dá, principalmente, pela deposição dos ovos no fígado e outros órgãos e pela carga parasitária que impõe ao organismo uma resposta inflamatória. Assim sendo, muitas pessoas tendem a permanecer assintomáticas de acordo com a intensidade da infecção o que dificulta, também, a quantificação de indivíduos infectados. Os sintomas clínicos estão relacionados com a fase de desenvolvimento do parasita no organismo humano, caracterizando a doença em uma fase aguda, e posteriormente, em uma fase crônica. Na primeira, pode ocorrer dermatite cercariana, ocasionada pela penetração das cercárias na pele, além de febre, dor abdominal e cefaleia. Após seis meses de infecção, a doença é caracterizada em fase crônica, acometendo fígado e intestino (PORDEUS *et al.*, 2008; VITORINO *et al.*, 2012).

1.1.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* é complexo, envolvendo dois hospedeiros, um intermediário invertebrado e um definitivo vertebrado. Os vermes adultos desenvolvem-se principalmente nas veias mesentéricas, onde acontece a oviposição. De um terço à metade dos ovos atravessam a mucosa intestinal e acabam sendo eliminados com as fezes. Ao alcançar o

meio externo favorável, como lagoas, açudes ou represas de água parada, esses se rompem liberando os miracídios. Para continuar o ciclo, os miracídios penetram o tegumento do hospedeiro intermediário, moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* (item 1.1.1.1), onde, por meio de reprodução assexuada, tornam-se esporocistos e, por fim, darão origem às formas infectantes para o homem, as cercárias (Figura 2) (CDC, 2016).



Figura 2: Fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*: A-ovo, B-miracídio, C-cercaria, D-vermes adultos, fêmea no canal ginecóforo do macho para acasalamento (BRASIL, 2014).

Essas, por sua vez, abandonam o molusco, ficando móveis em meio aquático até o contato com a pele do hospedeiro definitivo através da qual penetram ativamente. Ao adentrarem o corpo do homem, as cercárias transformam-se em esquistossômulos, ganham a circulação, dando origem às formas adultas do verme, que irão acasalar-se e, assim, reiniciar o ciclo (Figura 3) (REY, 1991).

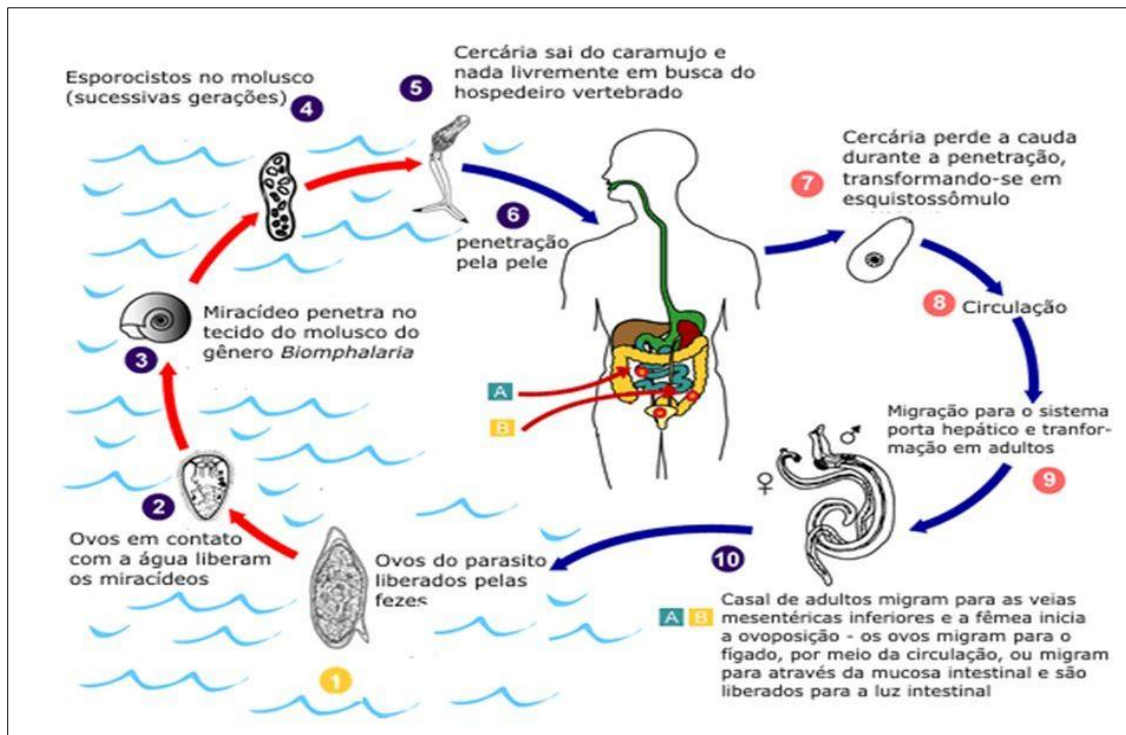


Figura 3: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de: Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

1.1.1.1 Hospedeiro intermediário

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria*. Esses caramujos habitam sistemas hídricos de água doce com pouca ou nenhuma correnteza como represas, lagos, lagoas e afins (CARVALHO *et al.*, 2008). Na América, as espécies *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* são consideradas os principais vetores da esquistossomose mansoni (SANTOS *et al.*, 2014). No Brasil as três espécies estão presentes ao longo de todo o litoral, porém *B. glabrata* é considerada a espécie hospedeira intermediária mais importante de *S. mansoni* na América, onde sua distribuição está fortemente associada às áreas de endemia (Figura 4) (CARVALHO *et al.*, 2008).



Figura 4: Distribuição espacial de *B. glabrata* no Brasil (CARVALHO; CALDEIRA, 2004)

Os caramujos (Figura 5A) são hermafroditas e capazes de se reproduzirem por autofecundação e fecundação cruzada, característica que desempenha um papel fundamental no seu êxito biológico (REY, 2008). Os ovos são postos e envoltos por uma substância gelatinosa e uma cápsula, que conferem proteção aos embriões (Figura 5B). Em condições laboratoriais, a eclosão se dá normalmente por volta do sétimo dia após a postura, sendo o processo de desenvolvimento da espécie caracterizado por cinco estágios embrionários: blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipoestádio (Figura 6) (BARBOSA, 1995). Após 30 dias, em média, os indivíduos atingem a maturidade sexual, sendo que, ao longo de seu tempo de vida é capaz de produzir aproximadamente 10 milhões de descendentes (SOUZA; LIMA, 1997).

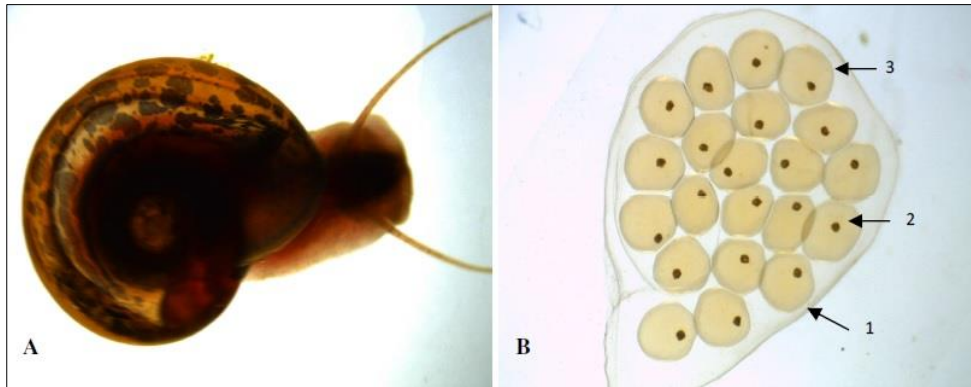


Figura 5: *Biomphalaria glabrata*. A- adulto. B- desovas com 21 embriões: 1- cápsula, 2- embrião e 3-membrana do ovo. Foto: Ludmila Nakamura Rapado.

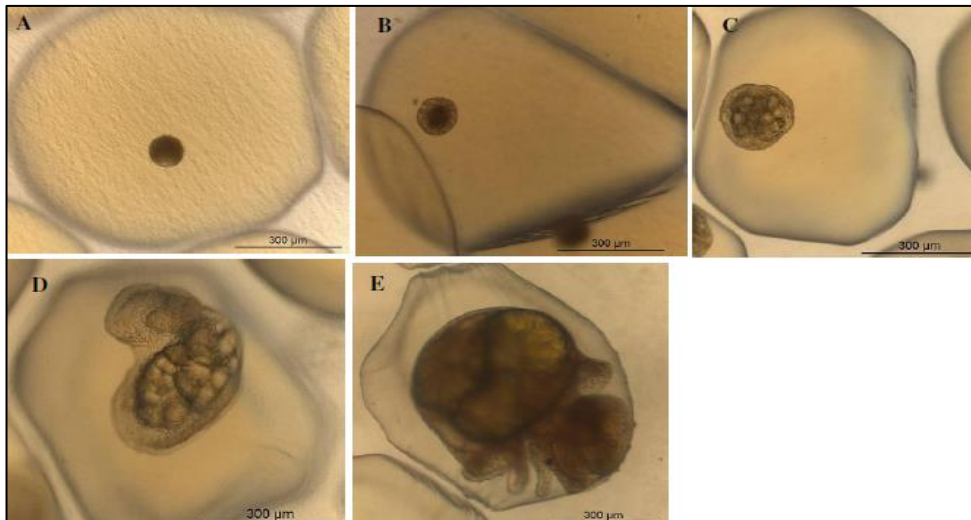


Figura 6: Estágios embrionários de *Biomphalaria glabrata* A- blástula, B- gástrula, C - trocófora, D- véliger e E- hipoestádio (pré-eclosão). Foto: Ludmila Nakamura Rapado

Como são bem conhecidos e de fácil definição, os estádios embrionários de *Biomphalaria* podem servir como base para estudos de toxicidade. Efeitos teratogênicos são facilmente observados devido à transparência das cápsulas da desova e dos ovos e sua postura em monocamada, o que facilita a identificação dos efeitos de substâncias químicas (KAWANO, 1983; KAWANO; SIMÕES, 1987; KAWANO; OKAZAKI; RÉ, 1992; NAKANO *et al.*, 2003; TALLARICO *et al.*, 2004).

1.2 HISTÓRICO DE CONTROLE

A OMS, a partir da década de 50, passou a revisar os conhecimentos disponíveis sobre a esquistossomose e os fatores associados à sua epidemiologia, bem como o vetor de

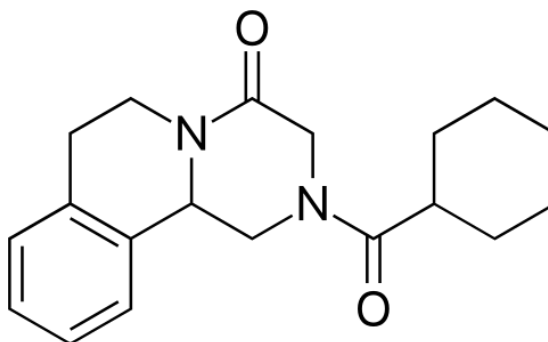
transmissão, estabelecendo metas prioritárias que visavam desde o desenvolvimento de métodos diagnósticos até a descoberta de compostos eficazes, seguros e alvo-específicos (WHO, 1953). Na década seguinte, o combate ao molusco hospedeiro foi apontado como a medida mais efetiva no controle da esquistossomose (WHO, 1961). Contudo, o controle da enfermidade só ocorreria por completo com a melhoria das condições higiênicas da população residente em áreas contaminadas.

Até a década de 70, a principal medida para o combate à esquistossomose ainda era a redução da população de moluscos utilizando-se os moluscidas já disponíveis, trabalhando-se nas técnicas de aplicação a fim de obterem-se melhores resultados a menores custos. Tal medida foi tomada devido à crítica à falta de padronização dos métodos de avaliação dos programas de controle até então implementados, além da ausência da área de comparação e a pouca duração do período de avaliação. O comitê não recomendava o desenvolvimento de novos esquistossomicidas, em função do alto custo das pesquisas clínicas e as exigências dos órgãos de saúde quanto à segurança dos produtos quimioterápicos. Reconhecia-se que o tratamento de indivíduos infectados conjuntamente com o controle dos moluscos tinha um impacto mais rápido sobre a incidência (WHO, 1973).

A partir dos anos 80, o hospedeiro humano tornava-se o foco dos programas de controle, passando a ser empregado de forma mais significativa o uso de quimioterápicos. Devido ao maior investimento da indústria farmacêutica em fármacos e formulações mais eficazes e ao custo crescente dos produtos moluscidas, a aplicação desses tornou-se secundária entre as medidas de controle da doença (WHO, 1980). Tal mudança fora possível devido aos resultados positivos no uso do praziquantel (Figura 7), substância desenvolvida pela Bayer ainda na década de 70, no tratamento de indivíduos infectados por qualquer espécie de *Schistosoma* (DAVIS et al., 1979; KATZ et al., 1979; ISHIZAKI, et al., 1979). Após a primeira patente em 1983 pela empresa coreana Shin Poong, houve aumento na competição pelo mercado, resultando em uma significativa redução de preço do fármaco, tornando-o mais acessível e facilitando sua distribuição aos países em maior necessidade (CIOLI, PICA-MATTOCCIA, 2003). Em função das possibilidades de ação da maioria dos países endêmicos, considerou-se o controle da morbidade como novo objetivo dos programas de controle da esquistossomose, prática que seguiu sendo adotada na década seguinte (WHO, 1985; WHO, 1993).

O controle do caramujo é realizado por meio da aplicação de moluscida químico, sendo esse considerado ótimo quando atinge critérios como: eliminação de todas as fases do ciclo de vida do caramujo em baixas concentrações nas condições as quais vive o animal,

baixo custo, estabilidade durante o armazenamento em temperaturas tropicais, fácil transporte e aplicação, ação letal seletiva, ausência de riscos ao homem, animais domésticos, peixes e plantas, não sofrer decomposição na água e estabilidade no solo (PAULINI, 1965; WHO, 1961, 1965, 1985).



Peso molecular: 312,4 g.mol⁻¹

Nome químico: (RS)-2-(ciclohexilcarbonyl)-1,2,3,6,7,11β-hexahidro-4H-pirazino (2,1-α) isoquinolina-4-ona

Fórmula química: C₁₉H₂₄N₂O₂

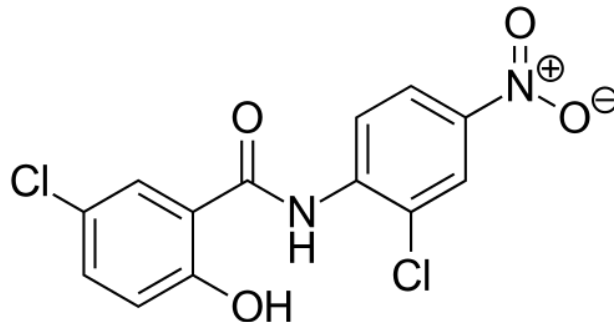
Registro CAS: 55268-74-1

Figura 7: Descrição química e molecular do praziquantel.

O Esquema de Avaliação de Pesticidas da Organização Mundial de Saúde (EAPOMS) recomenda o uso da niclosamida (2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida), produto desenvolvido para o controle de moluscos de água doce, em concentrações emulsificáveis e pó solúvel, cujas especificações estão disponíveis pela OMS. Outros moluscicidas, derivados da niclosamida, estão presentes no mercado como a niclosamida etanolamina 4% (pó seco), 5% formação granular, e 50% pó solúvel, além do metaldeído 1% acrescido de niclosamida-olamina 25% em concentrado de suspensão, porém, ainda necessitam passar por avaliação do EAPOMS (WHO, 2017). Atualmente, a estratégia para a redução na transmissão da esquistossomose visa o tratamento de doentes, medidas de educação em saúde, mobilização comunitária e saneamento, e controle biológico do hospedeiro intermediário através da utilização destes agentes químicos (WHO, 2017).

Contudo, a niclosamida (Figura 8) é o único moluscicida recomendado pela OMS, por ser menos danoso ao meio ambiente e mais efetivo comparado a outras substâncias sintéticas (ROCHA *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2014). Entretanto, o uso deste moluscicida sintético tem sido contestado pelos ambientalistas em relação a três fatores: baixa seletividade

(apresenta ação ictiotóxica), custo elevado e potencial desenvolvimento de resistência dos caramujos (CANTANHEDE *et al.*, 2010).



Peso molecular: 327,12 g.mol⁻¹

Nome químico: 2'5-dicloro-4'nitro-salicilanilida

Fórmula química: C₁₃H₈Cl₂N₂O₄

Registro CAS: 50-65-7

Figura 8: Descrição química e molecular da niclosamida.

Já o tratamento quimioterápico da esquistossomose mansônica propriamente dita é feito pela utilização de dois fármacos: oxaminiquina e praziquantel. Ambos os medicamentos apresentam limitações em suas atividades biológicas, como baixa eficácia no tratamento da doença na fase aguda, baixa atividade sobre o verme na forma imatura, além da possibilidade de induzir resistência ou tolerância (PORDEUS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Apesar do controle da esquistossomose por meio do tratamento dos doentes não impedir a reinfecção, ele é eficaz por garantir redução da morbidade e da transmissão (ARAÚJO, 2010).

Mundialmente, há um consenso sobre a importância da preservação da biodiversidade. Espécies de moluscos estão em risco em determinadas regiões e, mesmo o controle de suas populações sendo uma importante intervenção no controle da esquistossomose, a aplicação de moluscidas deve levar em consideração o impacto em organismos não alvo no ecossistema aquático. Considerada segura para animais associados a práticas pecuárias e aviárias, a niclosamida apresenta toxicidade a anfíbios, peixes e plantas aquáticas. Sua aplicação deve ser precedida de um reconhecimento ambiental e social da área de aplicação, a fim de monitorar qualquer possível impacto (WHO, 2017). Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de moluscidas de origem natural, não tóxicos ao meio ambiente e efetivos no combate ao molusco vetor (SILVA *et al.*, 2019).

1.3 POTENCIAIS ALTERNATIVAS

Outra forma de interromper o ciclo de vida da esquistossomose, além do controle dos moluscos hospedeiros, é através da eliminação da cercária, forma larval do parasita em meio aquático. A procura por efeitos cercaricidas em moluscicidas é relevante para o controle da esquistossomose, uma vez que a eficiência deste é potencializada ao apresentar toxicidade à forma livre de transmissão do parasita (MARSTON; HOSTETTMANN, 1991). Considerando isso, há demanda pelo uso de moluscicidas e cercaricidas que sejam cada vez mais seletivamente ativos, biodegradáveis, de baixo custo e prontamente disponíveis nas áreas afetadas. O alto custo de compostos sintéticos juntamente com a preocupação da possível resistência dos caramujos a esses compostos, além da sua toxicidade em organismos não-alvo, deram foco às pesquisas de moluscicidas e cercaricidas de origem vegetal (HOSTETTMANN, 1978). Como resultado da constante exposição a microrganismos patogênicos, insetos, herbívoros e outros predadores, plantas desenvolveram eficientes mecanismos de defesa, o que fica evidente devido às suas atividades inseticida (PAVELA, 2007), piscicida (BOSSARD, 1993), medicinal (JUNG *et al.*, 2004), entre outras. Além disso, regiões tropicais e subtropicais, onde a esquistossomose é endêmica, apresentam uma vasta gama de espécies que podem ser potenciais candidatas no controle dos moluscos vetores.

Até a década presente, diversos estudos têm demonstrado atividade moluscicida e larvicida de extratos de plantas. Todos seguem as especificações da OMS, que define o moluscicida como viável se a atividade tóxica em caramujos for detectada quando aplicadas concentrações iguais ou inferiores a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto isolado e menor ou igual a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato bruto (WHO, 1961, 1965, 1985).

Dos Santos *et al.* (2007) demonstraram atividade cercaricida de extratos da planta *Euphorbia conspicua* em concentrações de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a mesma atividade pode ser observada no trabalho de Vinaud *et al.* (2005), onde extratos de plantas *Stryphnodendron polyphyllum* e *S. adstringens* induziram mortalidade de cercárias de *S. mansoni*. A atividade biológica dos extratos de folhas, frutos maduros e frutos imaturos de *Solanum nigrum* var. *villosum* em indivíduos adultos de *Galba truncatula* foi identificada por Hammami *et al* (2011). Rapado *et al.* (2011) avaliaram o efeito de 15 espécies de Piperaceae em *B. glabrata*, e observaram que, dentre os extratos testados, 5 espécies foram ativas em concentrações inferiores a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ukwandu *et al* (2011) apresentaram resultados de atividade moluscicida em *B. pfeifferi* de extratos de frutos secos de *Piper guineense*. Rocha *et al* (2013) observaram efeito tóxico em *B. glabrata* expostos aos extratos de folhas e raízes de *Annona muricata* e *Jatropha elliptica*. Santos *et al* (2014) reportaram a mortalidade total de

indivíduos adultos de *B. glabrata* expostos a frações em clorofórmio e em acetato de etila do extrato de casca de *Schinopsis brasiliensis*. A atividade moluscicida nos quatro estádios embrionários e indivíduos adultos, a atividade sobre a fecundidade dos moluscos e atividade cercaricida do extrato em éter de *R. aspera* foi reportada por Silva *et al* (2019).

Outros estudos investigaram compostos presentes nos extratos que poderiam ser responsáveis pela atividade moluscicida de tais plantas. Hostettmann (1980) identificou quatro diferentes saponinas com atividade moluscicida em extrato metanólico de frutos de *Hedera helix* L. Bezzera *et al* (2002) demonstraram a atividade moluscicida em indivíduos adultos de *B. glabrata* ao expô-los a extratos de folhas e casca de *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Caryocar brasiliensis*, *Eugenia dysenterica*, constituídos principalmente de taninos condensados e flavonoides, mas também apresentando terpenos e ácidos fenólicos. Compostos isolados da planta *Millettia thonningii* mostraram ação cercaricida e esquistossomicida nos estudos de Lyddiard *et al* (2002). A atividade de sais de naftoquinonas sobre indivíduos adultos e desovas de *B. glabrata* e sobre cercarias de *S. mansoni* foi reportada por Lima *et al* (2002). Outras quatro saponinas obtidas de extrato metanólico de frutos de *Tetrapleura tetraptera* por Aladesanmi (2007) também demonstraram atividade em embriões de *B. glabrata*, além de atividade em miracídeos e cercarias de *S. mansoni*. Rapado (2012) observou a mortalidade de diferentes estádios de desovas de *B. glabrata*, além de alteração no padrão de movimento das cercárias, quando essas expostas à pipartina.

Contudo, mesmo com as pesquisas em busca de um composto de origem vegetal e de impacto ambiental menor que o causado pela niclosamida, até o presente momento, não há uma substância que possa ser considerada um produto eficaz. Obter um composto com atividade específica em caramujo/cercária apresenta-se como uma das maiores dificuldades em substâncias ativas extraídas de plantas, uma vez que as saponinas, mesmo em pequenas concentrações, também apresentam toxicidade a outros organismos do meio aquático. Além disso, compostos, como taninos, que apresentam baixa toxicidade a esses organismos, possuem baixo efeito moluscicida (COSTA; MORS, 1981; HOSTETTMAN; MARSTON, 1987).

1.3.1 Algas marinhas

O ambiente marinho apresenta uma riqueza de espécies capazes de produzir inúmeras estruturas químicas com potencial para descoberta de novos fármacos (MACHADO *et al.*, 2010). Neste contexto, as algas estão entre os principais produtores de metabólitos

secundários no ecossistema marinho, sendo sua principal aplicação comercial, na extração de ficocolóides, ácidos graxos, esteróis, carotenoides, lectinas, micosporinas, compostos halogenados e policetídeos. Em regiões tropicais, a diversidade de espécies marinhas é comparável àquela presente nas florestas tropicais. Contudo, estudos em relação a atividades biológicas de espécies algais ainda são escassos quando comparados aos de espécies de plantas terrestres (MOLINSKI *et al.*, 2009; GUIRY, 2018).

As algas marinhas podem ser classificadas em três grandes grupos: Chlorophyta ou algas verdes; Rhodophyta ou algas vermelhas; e Ochrophyta, que compreende o grupo das algas pardas (GUIRY, 2018). Todos os grupos apresentam espécies capazes de produzir metabólitos com diversas atividades biológicas descritas na literatura (NAGAYAMA *et al.*, 2002; HEO *et al.*, 2005; ATHUKORALA *et al.*, 2007; DEMIREL *et al.*, 2009; HEO *et al.*, 2010), entre elas: antiviral (PEREIRA *et al.*, 2004; KARADENIZ *et al.*, 2014), antibacteriana (BURKHOLDER; BURKHOLDER; ALMODÓVAR, 1960; NAIR; KALARIYA; CHANDA, 2005; SUJATHA; SIVA; NAWAS, 2018), antifúngica (STIRK; REINECKE; VAN STADEN, 2007; FENG *et al.*, 2015), anticoagulante (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; FAGGIO *et al.*, 2016), anti-inflamatória (YOON *et al.*, 2009; ITOH *et al.*, 2014), leishmanicida (PELEGRIN *et al.*, 2008) e moluscicida (MIYASATO *et al.*, 2012).

Ensaio preliminares de atividade biológica realizados em nosso laboratório demonstraram atividade moluscicida de três espécies do filo Ochrophyta, em embriões de *B. glabrata* expostos a 100 mg.L⁻¹ de extratos brutos e de uma espécie com atividade esquistossomicida. As espécies *Padina tetrastomatica* e *Canistrocarpus cervicornis* induziram 100% de mortalidade de embriões em estágio blástula; o mesmo resultado foi obtido ao expor os embriões aos extratos de *Dictyota mertensii* e *Dictyota ciliolata*, o qual ainda apresentou atividade letal de 100% em vermes adultos (dados não publicados). Stein *et al.* (2015) e Andregueti (2015) observaram mortalidade de vermes adultos *Schistosoma mansoni* expostos a extratos de *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e *D. mertensii* em concentrações de 100 ug.mL⁻¹, ensaios os quais também foram realizados em nosso laboratório.

Também fora demonstrada a atividade moluscicida de extratos de 14 espécies do filo Rhodophyta na concentração de 100 mg.L⁻¹, além da atividade esquistossomicida de seis espécies com ensaio realizado na mesma concentração. Embriões de *B. glabrata* em estágio blástula expostos a extratos de *Palisada flagellifera*, *Amphiroa fragilissima*, *Jania rubens*, *Dichotomaria marginata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* e *Solieria filiformis* apresentaram mortalidade de 100%. O extrato de *Porphyra*

spiralis induziu 100% de mortalidade em vermes adultos. Os extratos testados mais promissores, que apresentaram atividade letal em todos os modelos testados, tanto vermes quanto caramujos (embriões em estágio blástula e véliger), foram os extratos de *Ochtodes secundiramea*, *Laurencia aldingensis*, *Laurencia catarinenses*, *Laurencia dendroidea* e *Laurenciella sp* (dados não publicados).

Dessa forma, espécies de *Laurencia* apresentam-se entre as mais promissoras na procura por compostos com atividade moluscicida e esquistossomicida entre as espécies previamente testadas em nosso laboratório, uma vez que seus extratos apresentaram os melhores resultados de atividade biocida. A grande gama de compostos presentes com diferentes atividades biológicas já reportados na literatura torna as espécies de *Laurencia* um alvo de vasto potencial na obtenção de um novo composto a ser utilizado no controle e/ou tratamento da esquistossomose mansoni.

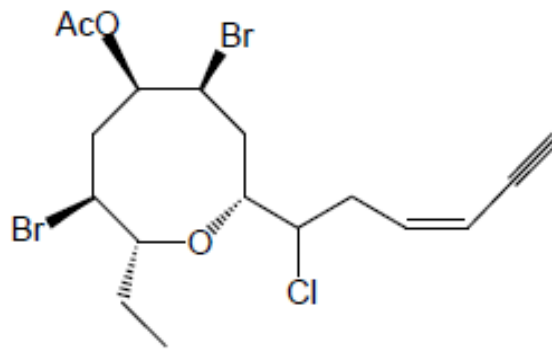
1.3.1.1 Gênero *Laurencia*

As algas vermelhas do gênero *Laurencia* se apresentam amplamente distribuídas em águas tropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, e apresentam 138 espécies taxonomicamente aceitas (GUIRY, 2020). No Brasil, sua distribuição litorânea compreende os estados de Santa Catarina à Bahia (TAYLOR, 1960; OLIVEIRA-FILHO, 1977; FUJII *et al.*, 2006; CREED *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Atualmente, existem muitos estudos com compostos químicos encontrados em espécies de *Laurencia* demonstrando atividade antioxidante (ANGGADIREDJA *et al.*, 1997), antiviral (SOARES *et al.*, 2012), antibacteriana (VAIRAPPAN, 2003), antifúngica (PERES *et al.*, 2012), anticoagulante (SHANMUGAM E MODY, 2000; LEE *et al.*, 2008).

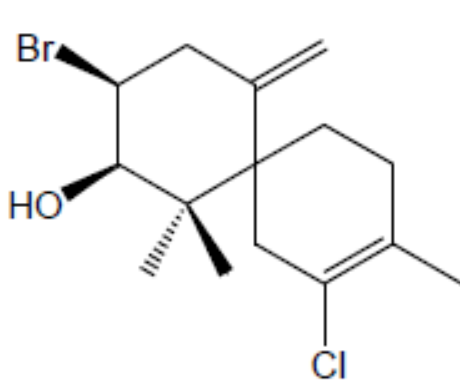
Extratos produzidos a partir de espécies de *Laurencia* apresentam um grande número e variedade de estruturas carbônicas. Algumas dessas estruturas diferem das sintetizadas por organismos vegetais terrestres em função da sua halogenação, capacidade de espécies marinhas de utilizar ions como cloro e bromo, presentes no mar, para a síntese de metabólitos secundários (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010).

Dentre os metabólitos secundários produzidos por espécies de *Laurencia*, estão presentes terpenos, inclusive halogenados, e acetogeninas (Figura 9A), classes químicas de grande importância devido aos seus potenciais bioativos (BARBOSA *et al.*, 2004; KOLESNIKOVA *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 2013). De acordo com o grau de conjugação define-se o tipo de terpeno: sesquiterpenos (n = 3) (Figura 9B), diterpenos (n =4) (Figura 9C), triterpenos (n = 6) (Figura 9D), carotenoide (n = 8), os quais são derivados do

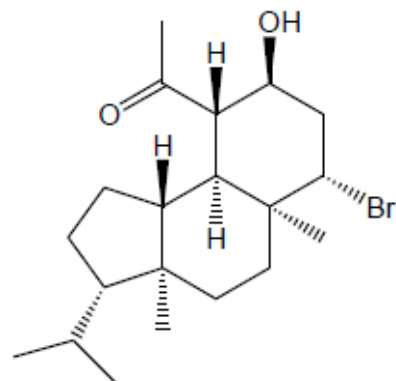
isopreno (C_5H_8)_n (MARTÍN & DARIAS, 1978; COLL *et al.*, 1989; WRIGHT *et al.*, 1991; WRIGHT *et al.*, 1993; PEREIRA & TEIXEIRA, 1999; FUJII *et al.*, 2011). Contudo, os diterpenos e triterpenos apresentam poucos exemplos conhecidos no gênero *Laurencia*, sendo os sesquiterpenos a classe de compostos mais abundante nessas espécies (LHULLIER, 2009).



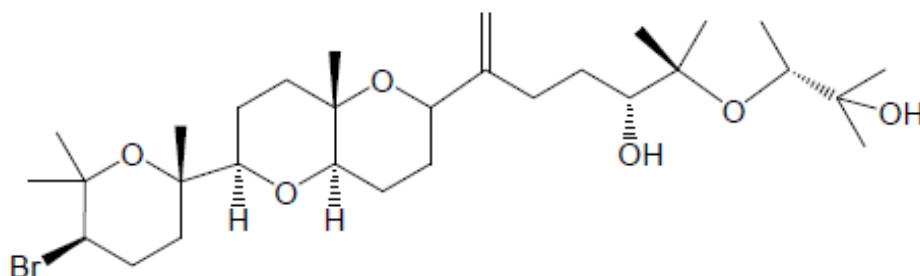
A) 10-acetoxi-6-cloro-9,12-dibromo-lausitan-3-eno-1-ino (acetogenina)



B) Elatol (sesquiterpeno halogenado)



C) Coronona (diterpeno)



D) Dehidrovenustatriol (triterpeno)

Figura 9: Exemplos de diferentes classes de metabólitos produzidos pelas espécies do gênero *Laurencia*. Modificado de: WANKE, 2014.

1.3.1.1.1 *Laurencia dendroidea*

Dentre as espécies de *Laurencia* capazes de sintetizar acetogeninas e terpenos halogenados, destaca-se a *Laurencia dendroidea* (Figura 10), amplamente estudada no território brasileiro devido à sua distribuição por toda a costa, pela grande variação em sua caracterização taxonômica e por sua riqueza de metabólitos secundários (CASSANO et al., 2012).



Figura 10: Exemplar da amostra da espécie *Laurencia dendroidea* no habitat natural na Praia dos Castelhanos, litoral do Espírito Santo (A). Aspecto geral do talo (B). Detalhe do ramo (C). Fotos: Erika Mattos Stein (STEIN, 2015).

Erroneamente descrita como *Focus obtusus* (Hudson) em 1778, apenas anos depois, com os avanços em ferramentas moleculares, fora incorporada ao gênero *Laurencia*. O que se justifica pela grande plasticidade fenotípica, possivelmente devido à sua característica cosmopolita, dificultando a caracterização de diversas amostras em diferentes regiões como organismos da mesma espécie.

Fenotipicamente, a *Laurencia dendroidea* se apresenta como uma alga marinha de cor esverdeada nos ramos principais e mais arroxeadada/avermelhada nos ramos derivados. Varia de 4 a 20 cm de altura. Talos de consistência cartilaginosa flácida. Os eixos principais possuem de 925 a 2750 μm de diâmetro em sua porção mediana do talo. Eixos cilíndricos com ramificação variando de uniformemente densa desde a base de planta a esparsa (CASSANO, 2009).

Dessa espécie de *Laurencia*, foram isolados diversos sesquiterpenos como obtusol, cartilagenol, obtusano (MACHADO et al., 2011). Dentre tais sesquiterpenos, destaca-se o elatol, composto já característico da espécie, pois pode ser isolado em grandes quantidades, com atividades diversas reportadas na literatura, como: anti-herbivoria (PEREIRA et al., 2003), anti-incrustante (DA GAMA et al., 2002), citotóxica (DIAS et al., 2005), anti-

microbiana (VAIRAPPAN, 2003), larvicida (BIANCO *et al.*, 2013), e de maiores interesses para esse estudo, anti-helmintica (DAVYT *et al.*, 2001) e tripanossomicida (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2010).

1.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE MOLUSCICIDA E CERCARICIDA EM *Laurencia dendroidea*

1.4.1 Métodos para identificação de compostos com atividade moluscicida e cercaricida

Tendo-se conhecimento da composição química e da presença de compostos bioativos do extrato bruto da espécie que teve sua atividade moluscicida e/ou cercaricida detectada, pode-se iniciar a busca por substâncias que conferem tal atividade a partir dos compostos cujas outras atividades biológicas já tenham sido descritas. Essa metodologia auxilia na seleção de compostos a serem estudados, bem como na identificação de classes de compostos ativos (RAPADO, 2012).

Pode-se, também, empregar o fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato bruto, avaliando-se a atividade moluscicida e/ou cercaricida e, adicionalmente, a composição química de cada fração obtida. Usualmente, técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN) são empregadas para obter-se tais perfis. Os dados obtidos no biomonitoramento são o guia para quais frações devem ser sub-fracionadas até que um composto isolado seja obtido (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

Fracionamentos biomonitorados geram uma grande quantidade de informação, por vezes subutilizada. Para auxiliar na busca de compostos com a atividade desejada e utilizar ao máximo os dados obtidos, faz-se uso de ferramentas de metabolômica. A metabolômica é uma emergente e valiosa ferramenta para estudar o fenótipo e as alterações nele causadas por influências ambientais, doenças ou modificações genotípicas (FIEHN, 2002). Essa não é uma tarefa simples, uma vez que metabolomas representam um vasto número de componentes que pertencem a uma gama de classes de compostos, como amino-ácidos, lipídios, ácidos orgânicos, nucleotídeos, etc. Tais compostos são muito diversos em suas propriedades físico-químicas e ocorrem em diversas concentrações, tornando sua avaliação conjunta praticamente impossível (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006). Todavia, é uma ferramenta cada vez mais aplicada, principalmente para elucidar o perfil metabólico de organismos vegetais em busca de candidatos a fármacos (CRAGIE; MACKINNON; WALTER, 2007; WANG;

JÓNSDÓTTIR; ÓLAFSDÓTTIR, 2009; PIERRE *et al.*, 2011; RAPADO, 2012; YULIANA *et al.*, 2013).

Atualmente, duas técnicas complementares são utilizadas para investigação metabolômica: perfil metabólico e padrão metabólico. O padrão metabólico é uma abordagem global e imparcial de triagem para classificar amostras com base em padrões de metabólitos ou *fingerprints* que mudam em resposta a doenças, perturbações ambientais ou genéticas com o objetivo final de identificar metabólitos discriminantes. Já o perfil metabólico é definido como a análise quantitativa de um conjunto de metabólitos em uma rota bioquímica selecionada ou em uma classe específica de compostos, podendo ter um alvo ou não (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006).

Os resultados do perfil metabólico são quantitativos e, idealmente, independentes da tecnologia usada para aquisição de dados. Consequentemente, os dados podem ser usados para criar bancos de dados que podem ser integrados com mapas de rotas bioquímicas ou outros dados de "ômicas", incrementando a compreensão biológica. Embora os dados quantitativos dos metabólitos de diferentes organismos modelo sejam abundantes na literatura, sua integração em bancos de dados globais ainda é baixa (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006). O que é especialmente verdade para as espécies de algas marinhas, cujas bibliotecas de metabólitos carecem de informação (JAMERS; BLUST; DE COEN, 2009).

Uma das formas mais empregadas de determinar o perfil metabólico é a metabolômica por espectrometria de massa, a qual oferece análises quantitativas com alta seletividade e sensibilidade para identificar metabólitos. A combinação com uma técnica de separação reduz a complexidade dos espectros de massa devido à diferenciação de metabólitos em uma dimensão de tempo, promovendo separação isobárica e fornecendo informações adicionais sobre as propriedades físico-químicas dos metabólitos (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006). Geralmente, para todos os tipos de experimentos de metabolômica baseada em espectrometria de massas seguem-se os passos denotados na Figura 11.

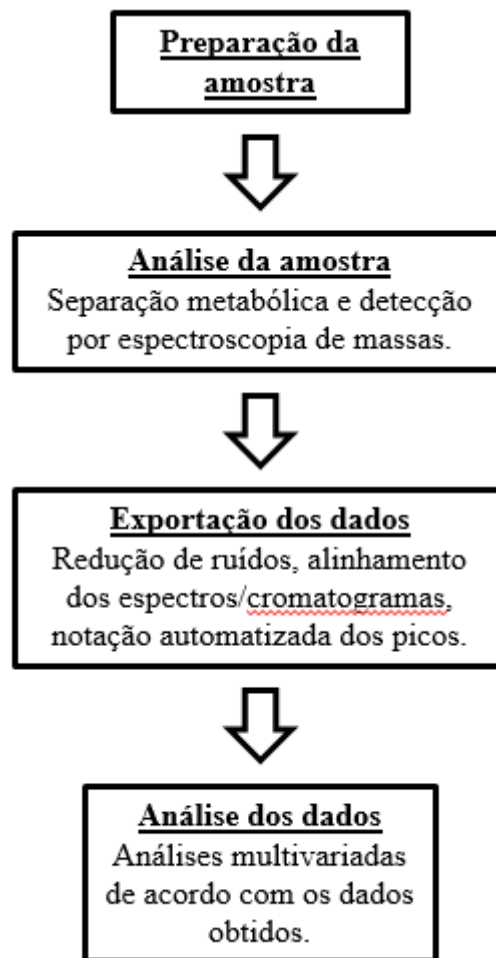


Figura 11: Fluxo de passos para análise metabólica por espectrometria de massas. Adaptado de (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2006).

1.4.2 Caracterização de compostos com atividade moluscicida e cercaricida

Segundo a OMS, após a seleção dos compostos na triagem, deve-se caracterizar o composto com base em sua atividade moluscicida através da determinação da concentração da substância necessária para causar a morte de 50% dos organismos alvo (CL50), caracterizando a potência do composto como moluscicida. Posteriormente, caracteriza-se a substância quanto a sua estabilidade sob efeitos de luminosidade e temperatura, a fim de determinar sua durabilidade em campo. Nessa fase de avaliação verifica-se também a toxicidade em animais e plantas não-alvo (WHO, 1983).

Dentro do território brasileiro, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabeleceu organismos como microcrustáceos (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*), microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*) e peixes (*Danio rerio* e

Pimephales promelas) como padrões para ensaios toxicológicos (ABNT, 2004a; ABNT, 2004b; ABNT, 2005).

É recomendável a avaliação em organismos de diferentes níveis tróficos para a previsão de efeitos ecotoxicológicos. Ensaio em animais invertebrados como os microcrustáceos são ideais para analisar impactos sobre a reprodutibilidade, uma vez que esses possuem ciclos reprodutivos curtos. Já, animais vertebrados como os peixes são recomendados em ensaios toxicológicos, pois mudanças fisiológicas e comportamentais podem ser rapidamente detectadas.

1.5 COMPOSTOS ANÁLOGOS

Mesmo com os mais recentes avanços da biologia molecular, biotecnologia e da genética contribuindo para a descoberta de novos tratamentos, a síntese orgânica ainda é a rota mais utilizada de obtenção de novos fármacos. Candidatos a fármacos tem estrutura química definida e muitas vezes, tem origem natural, sendo identificados a partir de técnicas de isolamento e posteriormente caracterizados como compostos ativos. Esses, por sua vez, podem originar compostos análogos, resultados de processos de modificação molecular, possibilitando a obtenção de um composto de atividade incrementada e de menor toxicidade (NIKOLOVA; JAWORSKA, 2004).

Um análogo químico é um composto cuja estrutura é semelhante ao de outro composto, porém difere dele em relação a determinado constituinte. Pode diferenciar-se em um ou mais átomos, grupos funcionais ou subestruturas, e são geralmente isoeletrônicos. Apesar de diversos exemplos como β -lactonas frequentemente possuírem atividade antibacteriana, fenetilaminas estarem relacionadas a atividade no sistema nervoso central, e que compostos nitro aromáticos tem atividade mutagênica, estruturas análogas não necessariamente possuem funções análogas, podendo possuir propriedades físicas, químicas, bioquímicas ou farmacêuticas completamente diferentes (MARTIN; KOFRON; TRAPHAGEN, 2002).

O estudo de compostos análogos como fonte de fármacos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas vem sendo aplicado, assim como em outras classes de fármacos, com foco em sua relação estrutura x atividade, e alvo farmacológico (como: enzimas, células superficiais do parasita, receptores nucleares e canais de ions), de forma que uma pesquisa biomédica orientada permita reduzir o custo e o tempo para comercializar novos produtos (DE OLIVEIRA et al., 2015). Nesse contexto, análogos naturais e sintéticos devem ser estudados e cuidadosamente avaliados como possível candidato a fármaco, considerando-

se os riscos e benefícios em relação a seu protótipo, buscando um composto de maior atividade, maior especificidade e menor toxicidade a organismos não alvo.

1.6 EPÍLOGO

A pesquisa de novos compostos alternativos a fármacos/biocidas existentes tem o intuito de garantir um composto mais econômico, biodegradável, eficiente e seguro (ROCHA *et al.*, 2013). Com a necessidade de encontrar compostos que atendam a estes requisitos e que também sejam alvo-específicos e menos tóxicos aos demais organismos do ambiente aquático, os ensaios de atividade cercaricida e moluscicida surgem como ferramenta para tal. Por compartilharem o mesmo ambiente, um produto que seja ativo em ambos, parasita na fase larval e vetor, é de grande interesse e de fácil aplicabilidade, podendo ser utilizado como pesticida. A bioprospecção de um produto com essa finalidade a partir de um organismo presente no ambiente aquático, como é o caso das algas, pode reduzir significativamente o risco de toxicidade ao ecossistema local.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a atividade moluscicida e cercaricida dos extratos da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, assim como dos compostos isolados a partir dele.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos tóxicos dos extratos sobre moluscos *Biomphalaria glabrata* em estágio embrionário
- Verificar a atividade dos extratos sobre cercárias de *S. mansoni*.
- Isolar os compostos ativos por meio de fracionamento bioguiado.
- Determinar as concentrações letais (CL₅₀) e (CL₉₀) dos compostos ativos estudados.
- Avaliar a toxicidade aguda dos compostos isolados em *Daphnia similis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO VEGETAL

A espécie de alga utilizada nesse estudo, *Laurencia dendroidea*, foi coletada no litoral do Espírito Santo, no município de Anchieta, a 80 quilômetros ao sul de Vitória, capital do estado, nas praias de Castelhanos e Ilhote da praia de Ubu, pelo grupo de pesquisa da Dr^a. Erika M. Stein.



Figura 12: Localização do ponto de coleta da macroalga marinha vermelha *L. dendroidea* utilizada no projeto.

Após a coleta, as algas foram triadas para remoção de impurezas, embaladas em sacos plásticos e armazenadas em refrigeradores a -20°C. Vouchers de cada local de coleta foram preparados para confirmação taxonômica, e depositados no herbário “Maria Eneyda P. K. Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo” sob os números SP 399.945 (Praia dos Castelhanos, Anchieta/ES; Coletada em: 01/07/2007), SP 399.806 (Praia dos Castelhanos, Anchieta/ES; Coletada em: 03/06/2008) e SP 400.905 (Ilhote da praia de Ubu, Anchieta/ES; Coleta em: 08/04/2009).

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Um pool das macroalgas congeladas, de diferentes períodos de coleta, foi colocado em béqueres de 250 mL para liofilização (Labconco 7753044). Quando completamente desidratadas, 127 g da amostra vegetal foram trituradas utilizando-se gral e pistilo, com a adição de nitrogênio líquido, até obter-se um pó. Em seguida, foi adicionado o solvente na proporção de 10:1 (v/m). Por fim, permaneceram em agitador (New Brunswick Scientific G76D) “overnight” até o início da filtração. Para macerar a biomassa algal foram utilizados quatro solventes com diferentes polaridades individualmente para esse processo, na seguinte sequência: éter de petróleo, diclorometano, metanol e água. O processo se deu de forma sequencial e não exaustiva, onde a mesma biomassa fora utilizada para a maceração com cada solvente. A filtração do extrato foi realizada em sistema de filtração a vácuo completo de 2000 mL, utilizando-se papel Whatman. Para cada solvente a maceração e a filtração foram realizadas três vezes, no qual após cada filtração o sobrenadante fora repostado no erlenmeyer.

Após a filtração, cada solução foi disposta em balão volumétrico de 1000 mL e concentrada usando-se rotaevaporador (Fisatom 803). O extrato obtido desse processo foi removido do balão com o acréscimo mínimo de solvente, e, então, colocado em frasco, previamente pesado, para armazenamento. A secagem completa dos extratos foi realizada usando-se gás nitrogênio. Em seguida, a massa dos extratos obtidos foi medida gravimetricamente e os rendimentos calculados conforme a Equação 1. Essa metodologia foi realizada no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, no Instituto de Química da USP.

$$\text{Rendimento} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{biomassatotal}}} \times 100 \quad (1)$$

3.3 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS CARAMUJOS

Foram utilizados espécimes de *Biomphalaria glabrata* coletados em Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, Minas Gerais) e cultivados em laboratório durante várias gerações. Os caramujos foram mantidos em sistema fechado de aquários plásticos (medindo 56x35x20 cm), com água filtrada, aeradores e temperatura controlada por aquecedor a 25° C (± 2) (Figura 13). A alimentação é realizada três vezes por semana com alface fresca *ad libitum* e a troca de água realizada a cada mês. As desovas dos animais são coletadas em recipientes plásticos semanalmente e alocadas em aquários berçários (30x16x10 cm).



Figura 13: Sistema fechado para criação de caramujo *B. glabrata* do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

3.4 FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

Os fracionamentos dos extratos de *L. dendroidea* foram realizados por técnicas de separação cromatográfica, conforme descrito no item 3.4.3.3. Fingerprint dos extratos, assim como das frações obtidas com o fracionamento foi realizado conforme os itens 3.4.3.1 e 3.4.3.2. O monitoramento da atividade moluscicida e cercaricida das frações provenientes do processo, realizado conforme os itens 3.4.1 e 3.4.2 respectivamente, guiou quais frações seriam submetidas à identificação por RMN conforme item 3.4.3.5 ou à nova purificação/subfracionamento.

3.4.1 Avaliação da atividade moluscicida

Foram colocadas fitas plásticas transparentes nos aquários de criação a fim de recolher desovas depositadas, sendo utilizadas para o ensaio de atividade moluscicida apenas aquelas que se apresentaram íntegras e com mais de 10 embriões por cápsula. Após a seleção das desovas, essas foram separadas de acordo com seu estágio embrionário: blástula, gástrula, trocófora e véliger.

Os grupos de desovas, contendo no mínimo 50 embriões cada, foram colocados em placas de cultura celular de 12 poços com capacidade de 6,3 mL contendo as soluções, mantidos em temperatura ambiente de 25°C (± 2). Os organismos foram mantidos expostos à solução dos extratos (100 mg.L⁻¹)/frações (50 mg.L⁻¹) por 24 horas e após esse período foram transferidos para outra placa de cultura celular de 48 poços, com apenas uma desova por poço, contendo apenas água filtrada até o final do experimento com duração de sete dias. Foi

utilizado um controle negativo contendo apenas uma solução de água deionizada/DMSO (3%). Os animais foram avaliados diariamente em microscópio estereoscópico, e ao fim do experimento, foram sacrificados e descartados. As variáveis observadas neste ensaio foram a letalidade e efeito teratogênico, e o processo foi realizado em triplicata.

3.4.2 Avaliação da atividade cercaricida

Para a obtenção das cercárias, caramujos infectados estão sendo mantidos no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, previamente autorizado pelo Comitê de Ética do instituto sob o protocolo 0123014. Amostras contendo 50 cercárias/mL de água deionizada (2 mL/grupo) foram expostas por 120 minutos aos extratos na concentração de 100 mg.L⁻¹, ou 50 mg.L⁻¹ no caso das frações, em placas de cultura de células.

A mortalidade dos organismos foi avaliada em microscópio estereoscópico em tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após o início da exposição. A letalidade é classificada como: completa - organismos apresentarem-se 100% imóveis; toxicidade forte - 90% imóvel no fundo da placa; toxicidade média - 50 a 90% imóvel e/ou no fundo da placa; e inativo - menos de 50% imóveis e/ou no fundo da placa (DOS SANTOS *et al.*, 2007). O controle negativo foi mantido em água deionizada/DMSO nas mesmas proporções em que foram preparados os extratos, como nos estudos de Rapado (2012).

3.4.3 Avaliação das atividades moluscidas e cercaricidas de compostos análogos

A avaliação da atividade de compostos análogos recebidos de laboratórios parceiros se dá segundo a metodologia apresentada nos itens 3.4.1 e 3.4.2 para atividade moluscida e cercaricida respectivamente, entretanto, fora testada uma única concentração de 25 mg.L⁻¹. Essa foi selecionada pois é uma concentração comum utilizada nos dois testes para o composto isolado em fracionamento. Além disso, em função da baixa quantidade das substâncias análogas, tal concentração possibilitou o menor número de preparos de solução.

3.4.4 Análises químicas

Técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram utilizadas para se obter o fingerprint (perfil cromatográfico) dos extratos testados.

Os extratos ativos nos testes descritos nos itens 4.3 e 4.4 foram fracionados por técnicas de cromatografia líquida em coluna (CLC) sob pressão ambiente e cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE); as frações obtidas foram novamente testadas quanto às suas atividades biológicas para isolamento dos compostos ativos.

Os processos de cromatografia a seguir explanados foram realizados no Instituto de Química da USP sob supervisão da Dr^a Erika M. Stein.

3.4.4.1 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

Nas análises por CG-EM utilizou-se coluna cromatográfica (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano (30 m x 250 µm x 0,25 µm) (Agilent J&W HP-5MS) e a corrida foi programada baseando-se em Stein (2015) e Gressler et al. (2011) com o programa condicionado à temperatura do injetor de 220 °C; rampa de temperatura do forno de 60 °C a 240 °C, com aumento de 3 °C por minuto e mantida a 240 °C por 40 minutos. A temperatura da interface e do detector foi de 240 °C, volume de injeção de 1 µL (da solução 1 mg.mL⁻¹ em diclorometano) com Split 1:5 e hélio usado como gás de arraste. O fluxo de trabalho foi de 1 mL/min e o modo de ionização, por impacto de elétrons.

O método de identificação dos constituintes químicos escolhido foi o modo scan de 40 -1000 *m/z* com recurso às bibliotecas NIST 08 e NIST 08 s, disponíveis no equipamento GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) e NIST Mass Spectral Search Program da NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0, e também por meio de comparação dos índices de retenção linear (Índice de Kovat's) calculado em relação aos tempos de retenção (*T_R*) de uma série homóloga de *n*-alcanos (padrões Sigma-Aldrich) conforme a equação 2 abaixo:

$$IK = 100 \times NC + 100 \times \left[\frac{T_R(X) - T_R(PZ)}{T_R(PZ+1) - T_R(PZ)} \right] \quad (2)$$

Onde:

NC é número de carbonos do padrão hidrocarboneto anterior;

X é o tempo de retenção do componente em análise;

PZ é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao componente avaliado;

PZ+1 é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao componente avaliado.

Para substâncias cujos IK iguais ou semelhantes foram encontrados na literatura foram considerados percentuais de similaridade iguais ou superiores a 80%. No caso de substâncias cujos IK não foram encontrados na literatura, considerou-se apenas o percentual de similaridade proporcionado pelas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s, assim como a

comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis em literatura e nas outras bibliotecas.

A concentração relativa (%) dos constituintes presentes em cada fração de extrato foi realizada de modo semi-quantitativo. A análise embasou-se na integração de todos os picos obtidos no TIC (*Total Ion Chromatogram*) e subsequente comparação da área relativa de cada pico em relação ao somatório das áreas relativas dos picos presentes no cromatograma.

3.4.4.2 Cromatografia em camada delgada

Nas análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 (Merck) de fase normal com indicador de UV (254 nm) (20 cm x 20 cm x 0,1 mm). Após eluição com diclorometano/metanol 2% ou hexano/acetona 10%, as placas foram reveladas com reagente de Komarowsky (solução de 1 mL de ácido sulfúrico 50% em 10 mL de p-hidroxi-benzaldeído em etanol (2%)) seguido de aquecimento (WAKSMUNDZKA-HAJNOS *et al.*, 2008). As frações coletadas e analisadas por CCD foram agrupadas de acordo com a semelhança em seus perfis.

Para as corridas dos extratos foram calculados os Fatores de Retenção (Fr). O cálculo é realizado medindo-se a distância que a substância se deslocou a partir do ponto em que foi aplicada (Ds), a partir do centro de gravidade de mancha e divide-se pela distância percorrida pela massa de solvente a partir da amostra (Dm).

$$Fr = \frac{D_s}{D_m} \quad (3)$$

Para calcular o fator de retenção para cada amostra analisada utiliza-se:

$$Fr = a/v \quad (4)$$

Onde:

a: distância percorrida pelo composto;

v: distância percorrida pelo solvente.

3.4.4.3 Cromatografia líquida em coluna (CLC) sob pressão ambiente

O fracionamento por cromatografia líquida foi realizado em coluna aberta (1,50 m x 3 cm) preenchida com a mistura de sílica gel 60 (0,063-0,2 mm/70-230 mesh ASTM) e fase móvel. Para determinar a melhor fase móvel a ser utilizada foram realizados testes em CCD com as seguintes combinações de solventes: hexano:acetona (9:1); hexano:acetona (85:15), diclorometano:metanol (99,5:0,5) e diclorometano:metanol (8:2).

O eluente hexano:acetona (9:1) foi selecionado para uso com o extrato macerado em metanol e diclorometano:metanol (99,5:0,5) com os extratos macerado em éter de petróleo e diclorometano. A reposição constante da fase móvel na coluna foi realizada utilizando-se bomba peristáltica, num fluxo de 1,4 mL/min.

3.4.4.4 Identificação estrutural dos compostos ativos

A identificação estrutural das substâncias ativas obtidas por meio do fracionamento bioguiado foi realizada por método espectroscópico, como a ressonância magnética nuclear (RMN), em equipamento Bruker Avance III operado a 500 MHz equipado com sonda de 5 mm TXI com canais dedicados para ^1H , ^{13}C e ^{15}N , de detecção inversa e com gradiente de campo e *software* topSpin 3.6 (Bruker).

3.5 ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS DE CG-EM

A fim de obter informações precisas e relevantes a partir das medidas obtidas dos dados em CG-EM de cada fração e facilitar sua interpretação, foi utilizado o software de acesso livre *R* versão 3.5.0 e o pacote de tratamento de dados XCMS, ferramenta usualmente utilizada em tratamentos de dados metabolômicos. Para adequar o XCMS à análise de dados de CG-EM foram alterados os seguintes parâmetros: largura à meia altura do pico (*fwhm*, *full width at half maximum*), *threshold* (*snthresh*) e a largura dos picos (*bw*) para os valores 4, 5 e 2 respectivamente (CRUZ, 2017).

Os dados passaram por uma etapa de detecção de picos (*xcmsSet*), agrupamento de picos (*group*), correção do tempo de retenção (*retcor*), reagrupamento de picos, preenchimento de valores (*fillPeaks*) e comparação univariada (*diffreport*).

Após o tratamento dos dados, para melhor representação gráfica, optou-se por parear os dados de tempo de retenção (TR) e de razão massa/carga (*mz*) em uma única variável, denominada “par *mz/TR*”, representativa de um possível composto. Os mesmos foram então representados com os resultados de atividade moluscicida de cada fração, obtendo-se sobreposições de compostos com mesmo par *mz/TR* presentes em diferentes frações com níveis de atividade biológica diferentes.

3.6 ENSAIOS DE TOXICIDADE

Os ensaios foram realizados utilizando indivíduos recém-nascidos, com idade entre 6 e 24 h de vida, de *Daphnia similis*, de acordo com a norma ABNT NBR 127 13 (2004^a). A concentração avaliada do composto isolado foi a menor concentração com 100% de atividade

moluscicida, além de uma concentração dez vezes menor. A água utilizada nos ensaios teve sua dureza ajustada para 46 mg.L^{-1} de CaCO_3 e o pH para $7,0 \pm 0,5$. DMSO 1% foi utilizado como controle negativo.

Neste ensaio de toxicidade observa-se a imobilidade dos indivíduos expostos dentro da coluna d'água, sendo considerados imóveis aqueles que não apresentaram ação natatória durante 15 segundos de observação, caracterizando atividade tóxica do composto sobre o animal. Os ensaios foram realizados em quatro réplicas com 5 organismos por concentração. Todos foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) com colaboração da Prof^a Dr^a Sueli Ivone Borrely.

3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

Para avaliar possíveis efeitos dos compostos isolados na morfologia das cercárias de *S. mansoni*, realizou-se a observação dos animais sob microscópio confocal de varredura a laser (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Carl Zeiss Inc). Os parasitas foram fixados em solução de formaldeído (70%), diacetato de fluoresceína e água destilada em proporção (v/v) [1:0,1:6]. Os efeitos dos compostos na região superficial dos indivíduos foram analisados de forma qualitativa, comparando visualmente o estado dos animais em relação ao grupo controle.

Todas as imagens foram obtidas sob tutoria do especialista em microscopia do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan: Alexsander Seixas de Souza.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de toxicidade em *Biomphalaria glabrata* foram determinadas as concentrações letais medianas, que agem em 50% da população exposta (CL_{50}), incluindo os intervalos de confiança de 95% que foram estimados por uma variação do método de Trimmed Spearman-Kärber. Essas foram realizadas com auxílio do Prof^o. Dr^o. Carlos Alberto de Bragança do Instituto de Matemática e Estatística da USP.

4 RESULTADOS

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Do pool de amostras da espécie *Laurencia dendroidea* (LD) com o qual seguiu-se para uma extração sequencial com solventes de diferentes polaridades, o extrato em éter de petróleo resultou em 4,82 g (3,80%), do extrato em diclorometano obteve-se 2,47 g (1,94%), e 18,49 g (14,56%) de extrato da maceração com metanol. Não foi possível determinar a massa de extrato em água, uma vez que nem todo o material teve seu solvente removido.

4.2 ATIVIDADE MOLUSCICIDA DOS EXTRATOS

O ensaio foi realizado para verificar a atividade moluscicida de cada extrato, como descrito no item 3.4. Após 24 h de exposição os organismos em estágio de blástula sob ação dos extratos de éter de petróleo e diclorometano apresentaram 100% de mortalidade. E, ainda, todos os embriões do grupo em extrato metanólico já apresentavam malformações, sendo a sua morte verificada após 48 h de exposição. Para os animais em estágio véliger, o mesmo resultado pode ser observado, porém, não houve malformações nos animais submetidos ao extrato metanólico, sendo verificada apenas a morte após 48 h. O extrato de água foi considerado não-efetivo, pois não acarretou na malformação ou morte de nenhum dos embriões expostos (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado do ensaio de toxicidade dos extratos brutos de *Laurencia dendroidea* (LD) com base no número de animais mortos após 7 dias de exposição.

Extrato	Estádio	Embriões		
		Concentração (mg.L ⁻¹)	Nº Embriões testados	Nº Embriões mortos (% mortalidade)
LD-Éter de Petróleo	Blástula	100	75	75 (100)
	Véliger	100	86	86 (100)
LD-Diclorometano	Blástula	100	94	94 (100)
	Véliger	100	66	66 (100)
LD-Metanol	Blástula	100	73	73 (100)
	Véliger	100	59	59 (100)
LD-Água	Blástula	100	66	0 (0)
	Véliger	100	65	0 (0)
Controle Negativo	Blástula	0*	57	0 (0)
	Véliger	0*	84	0 (0)

*0 = DMSO 1,5%

4.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO (FINGERPRINT) DOS EXTRATOS BRUTOS POR CG-EM E CCD

A análise por cromatografia a gás foi realizada a fim de obter-se um perfil dos extratos preparados, permitindo a avaliação da complexidade dos mesmos. Além de servir como garantia da estabilidade frente à degradação ao longo de todo o período de estudo. As figuras 14-17 mostram os cromatogramas dos extratos em éter de petróleo, diclorometano e metanol, nesta ordem. O método utilizado se mostrou reprodutível para as amostras estudadas, conseguiu fazer boa separação dos compostos constituintes. Contudo, as bibliotecas disponíveis ainda são limitadas para compostos oriundos de organismos marinhos.

Observando-se os cromatogramas, a maior parte dos picos apresenta tempo de retenção entre 20 e 60 min, mostrando que o método utilizado garantiu análise completa dos extratos. A utilização de coluna (HP-5MS), por ser apolar, contribui para análises de substâncias em extratos preparados com solventes orgânicos como o diclorometano e o éter de petróleo, que são capazes de extrair compostos como ácidos graxos e terpenos.

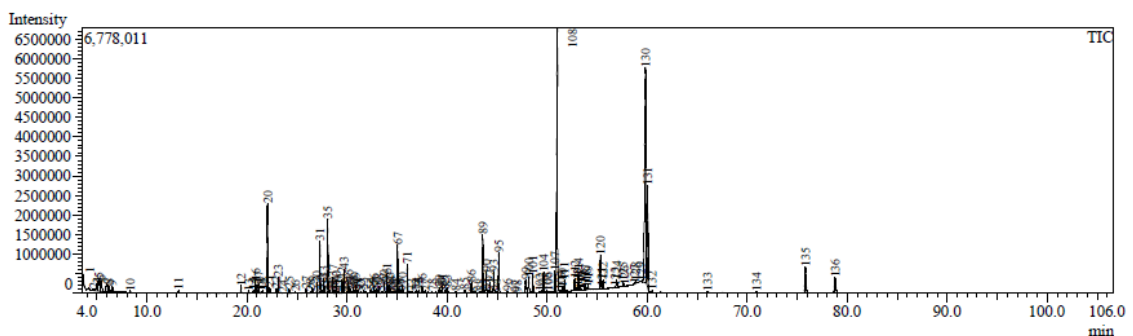


Figura 14: Cromatograma do extrato em éter de petróleo de *L. dendroidea* obtido por CG-EM.

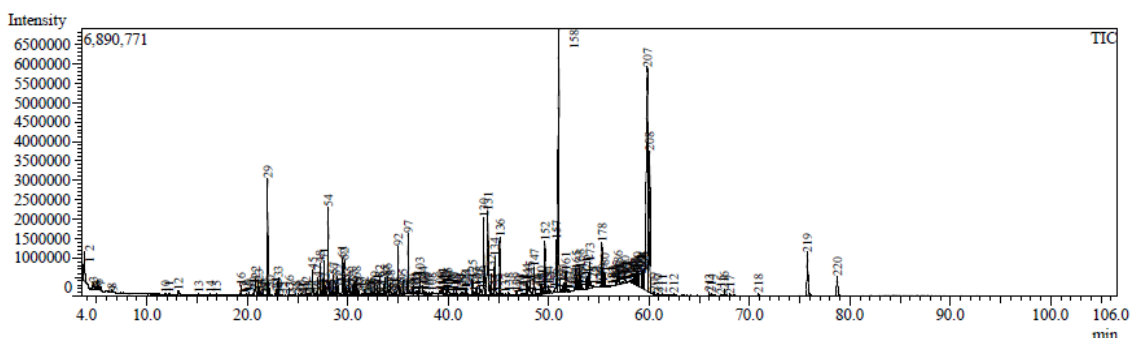


Figura 15: Cromatograma do extrato em diclorometano de *L. dendroidea* obtido por CG-EM.

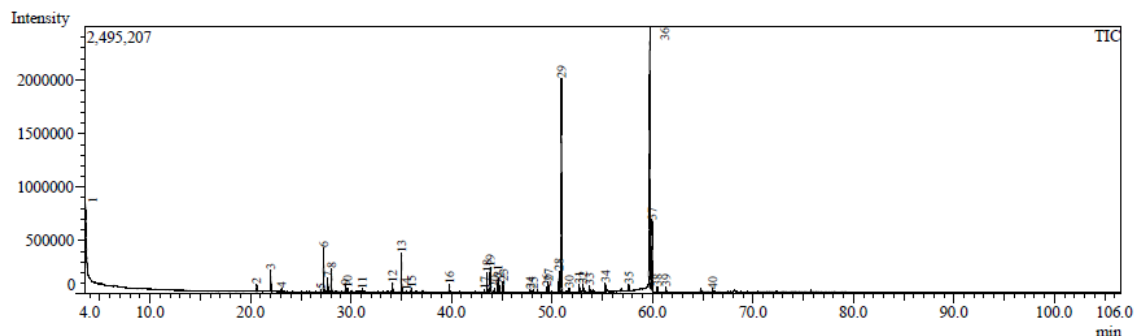


Figura 16: Cromatograma do extrato em metanol de *L. dendroidea* obtido por CG-EM.

Os cromatogramas gerados apresentam amostras bastante complexas, que contém uma enorme variedade de metabólitos secundários pertencentes às mais diferentes classes químicas segundo as bibliotecas disponíveis. Na análise qualitativa e semi-quantitativa (Anexo 8) pudemos identificar nos extratos substâncias como o longifoleno (IS: 87%; IK_{ob} : 1548) cujos produtos da autoxidação apresentam ação inseticida (MUKAI; TAKAHASHI; ASHITANI, 2017); e o 1H-pyrrole-2,5-dione (IS: 86%; IK_{ob} : 1227) funcional na geração de células endoteliais (SONG et al., 2015).

Os picos em 51 e 59 min são majoritários em todos os extratos analisados. Apesar de não ter sido possível identifica-los através das bibliotecas presentes no equipamento, o primeiro apresentou 70% de similaridade com o acetato de elatol e o segundo pico apresentou IS de 73% com o acetato de iso-obtusol.

Nas análises de CCD optou-se pela utilização da fase móvel diclorometano:metanol (99,5:0,5) para o fracionamento dos extratos com éter e diclorometano e da fase móvel hexano:acetona (9:1) para o fracionamento do extrato metanólico, já que essas apresentam melhor separação e resolução dos compostos que constituem os extratos.

Após realização das CCD dos extratos em éter de petróleo e diclorometano (Anexo 4) pudemos novamente observar a grande quantidade de substâncias em sua composição, demonstrado pelas diferentes bandas em diferentes cores na placa; resultado condizente com a análise em CG-EM, na qual os mesmos extratos apresentam um maior número de picos. Além disso, há a presença de bandas de mesma coloração e mesmo Fator de Retenção (Fr) em diferentes extratos, indicando que um mesmo composto pode ser prospectado utilizando-se diferentes solventes, como é o caso da banda azul escura e da banda rosa (Anexo 4), que apresentam valores de Fr iguais a 2,49 e 1,93, respectivamente, nos extratos de éter de petróleo e diclorometano.

4.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO

4.4.1 Frações do extrato em diclorometano

Conforme elucidado no item 3.6.3, foi realizado o fracionamento do extrato de *Laurencia dendroidea* em diclorometano, utilizando a fase móvel determinada no resultado do item 4.2. Após 72 h, toda a amostra foi eluída, gerando um total de 342 frações. Após a realização da CCD de cada uma das frações, essas foram reunidas conforme apresentavam o mesmo perfil, obtendo-se por fim um total de 44 frações, cujas massas estão indicadas na Tabela 2.

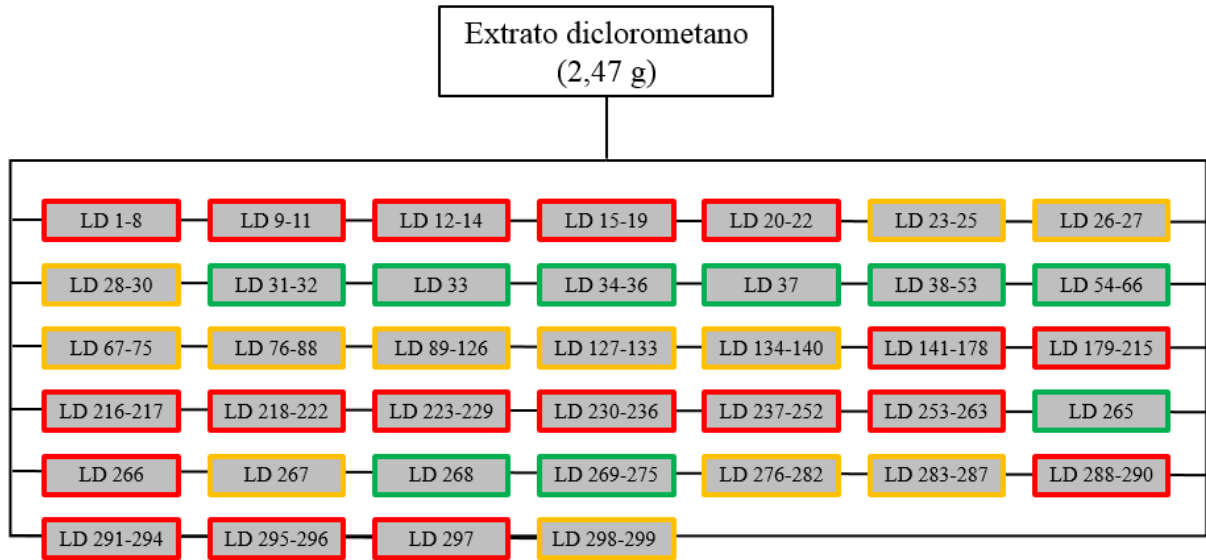
4.4.1.1 Atividade moluscicida das frações LD-DCM

Desovas em estágio blástula e véliger foram expostas a soluções de todas as frações de acordo com a metodologia do item 3.4. Após 24 h foi constatada a morte dos animais em ambos os estádios embrionários expostos às soluções das frações LD-DCM 31-32, LD-DCM 33, LD-DCM 34-36, LD-DCM 37, LD-DCM 38-53, LD-DCM 265, LD-DCM 268, LD-DCM 269-275, denotadas em verde na Figura 18. Também fora detectada a morte das desovas nos dois estádios expostas à solução da fração LD-DCM 54-66, contudo, a morte dos animais em estágio véliger foi confirmada apenas após 48 h de exposição.

As soluções das frações LD-DCM 23-25, LD-DCM 26-27, LD-DCM 28-30, LD-DCM 67-75, LD-DCM 76-88, LD-DCM 89-126, LD-DCM 127-133, LD-DCM 134-140, LD-DCM 267, LD-DCM 276-282, LD-DCM 283-287 e LD-DCM 298-299 acarretaram na morte dos organismos em estágio blástula após 24 h de exposição, porém não foi detectado nenhum sinal de atividade biológica nos animais em estágio véliger durante os sete dias de experimento. Indivíduos em estágio blástula tiveram sua morte confirmada após 48 h de exposição à solução da fração LD-DCM 179-215.

Não houve mortes ou malformações em desovas, em nenhum estágio, expostas a soluções das frações LD-DCM 1-8, LD-DCM 9-11, LD-DCM 12-14, LD-DCM 15-19, LD-DCM 20-22, LD-DCM 141-178, LD-DCM 216-217, LD-DCM 218-222, LD-DCM 223-229, LD-DCM 230-236, LD-DCM 237-252, LD-DCM 253-263, LD-DCM 266, LD-DCM 288-290, LD-DCM 291-294, LD-DCM 295-296, LD-DCM 297.

Figura 17: Fluxograma de fracionamento do extrato em diclorometano de *L. dendroidea* biomonitorado pela atividade moluscicida em *B. glabrata*.



Legenda (% mortalidade):

- Ativo (100%)
- Atividade intermediária (0% < 100%)
- Inativo (0%)

Tabela 2: Frações obtidas após fracionamento em coluna aberta do extrato de LD em diclorometano e suas respectivas massas.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
LD-DCM	30	LD-DCM	10	LD-DCM	60	LD-DCM	40	LD-DCM	10
1-8		33		134-140		265		295-296	
LD-DCM	20	LD-DCM	60	LD-DCM	60	LD-DCM	10	LD-DCM	30
9-11		34-36		141-178		266		297	
LD-DCM	40	LD-DCM	30	LD-DCM	80	LD-DCM	10	LD-DCM	20
12-14		37		179-215		267		298-299	
LD-DCM	50	LD-DCM	70	LD-DCM	10	LD-DCM	10		
15-19		38-53		216-217		268			
LD-DCM	30	LD-DCM	40	LD-DCM	70	LD-DCM	30		
20-22		54-66		218-222		269-275			
LD-DCM	10	LD-DCM	50	LD-DCM	70	LD-DCM	50		
23-25		67-75		223-229		276-282			
LD-DCM	10	LD-DCM	60	LD-DCM	50	LD-DCM	20		
26-27		76-88		230-236		283-287			
LD-DCM	20	LD-DCM	90	LD-DCM	30	LD-DCM	10		
28-30		89-126		237-252		288-290			
LD-DCM	10	LD-DCM	60	LD-DCM	20	LD-DCM	20		
31-32		127-133		253-263		291-294			

4.4.1.2 Atividade cercaricida das frações LD-DCM

De acordo com o que fora explanado no item 3.5, as cercarias foram expostas a soluções de todas as frações. Após cinco minutos de exposição foi detectada a morte dos parasitas expostos a soluções das frações LD-DCM 23-25, LD-DCM 26-27, LD-DCM 31-32, LD-DCM 33, LD-DCM 34-36, LD-DCM 37, LD-DCM 38-53, LD-DCM 54-66, LD-DCM 67-75, LD-DCM 265, LD-DCM 267, LD-DCM 268, LD-DCM 269-275, LD-DCM 276-282 e LD-DCM 283-287, denotadas em verde na Figura 18.

Os animais expostos à solução da fração LD-DCM 28-30 também tiveram a morte confirmada após 15 minutos de exposição. Após 60 minutos de exposição, os organismos expostos às frações LD-DCM 12-14, LD-DCM 15-19 e LD-DCM 20-22 também tiveram a morte detectada. As demais frações apresentaram no máximo toxicidade média.

Figura 18: Fluxograma de fracionamento do extrato em diclorometano de *L. dendroidea* biomonitorado pela atividade cercaricida em *S. mansoni*.



Legenda (% mortalidade):

- Ativo (100%)
- Atividade intermediária (0% < 100%)
- Inativo (0%)

4.4.1.3 Identificação do composto ativo

De acordo com os resultados obtidos nos testes de atividade biológica, juntamente com a observação dos perfis obtidos em CCD e CG-EM a fração LD-DCM 37 foi submetida à análise por RMN, uma vez que esta foi uma das frações ativas e cuja banda apresentou-se mais pura (Anexo 5). No espectro de RMN de ^{13}C , foram contados 15 sinais, entre os quais

cinco pertencem a carbonos quaternários (δ 140,7, 128,0, 124,1, 49,1 e 43,1 ppm), dois a carbonos metínicos (δ 72,2 e 70,9 ppm), quatro a carbonos de grupos metilênicos (δ 38,6, 38,0, 29,3 e 25,6 ppm), um carbono metidilênico (δ 115,9), e três a carbonos pertencentes a grupos metílicos (δ 24,2, 20,7 e 19,4 ppm) (Figura 19). Desses 15, quatro são carbonos sp² (C2, 128,0 ppm; C3, 124,1 ppm; C7, 140,7 ppm; C14, 115,9 ppm).

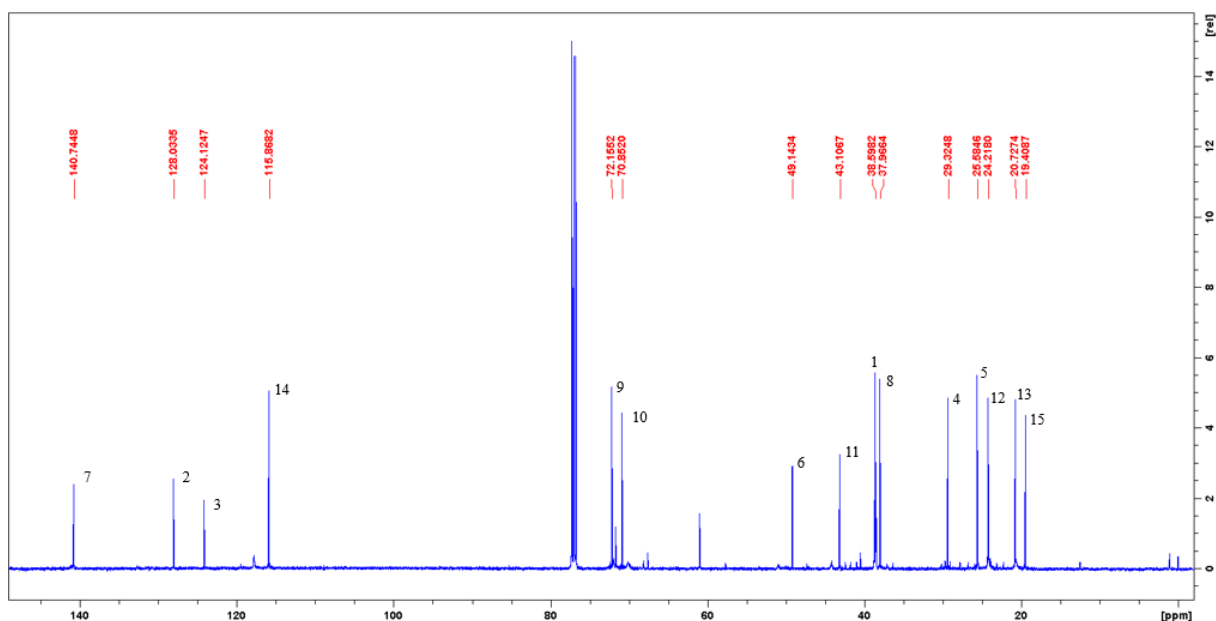


Figura 19: Espectro de RMN de ¹³C (CDC₁₃, 500 MHz) da substância isolada.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 20) foram observados dois simpletos (δ 1,06 e 1,07 ppm) que correspondem aos prótons dos carbonos metílicos C-12 (δ 19,7 ppm) e C-13 (δ 23,2 ppm), respectivamente. Um simpleto largo (δ 1,70 ppm) correspondente a um grupo metílico ligado ao carbono pertencente à ligação dupla endocíclica (C-15, δ 18,4 ppm). Um quadrupeto em δ 4,14 ppm refere-se a hidrogênio ligado a carbono terciário portando hidroxila (C-9, δ 71,2 ppm). Um duplete em δ 4,61 ppm, correspondente a um hidrogênio ligado a carbono terciário portando bromo (C-10, δ 69,9 ppm). Dois simpletos largos em δ 4,79 e 5,12 ppm, referem-se aos hidrogênios de grupo metilidênico exocíclico (C-14, δ 114,9 ppm).

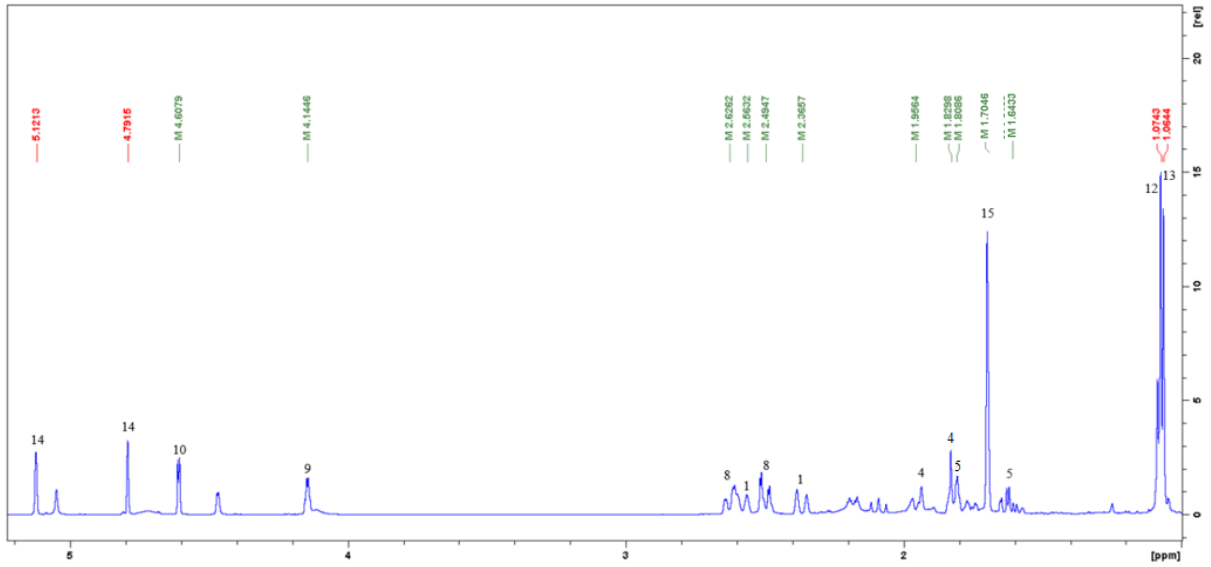


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada.

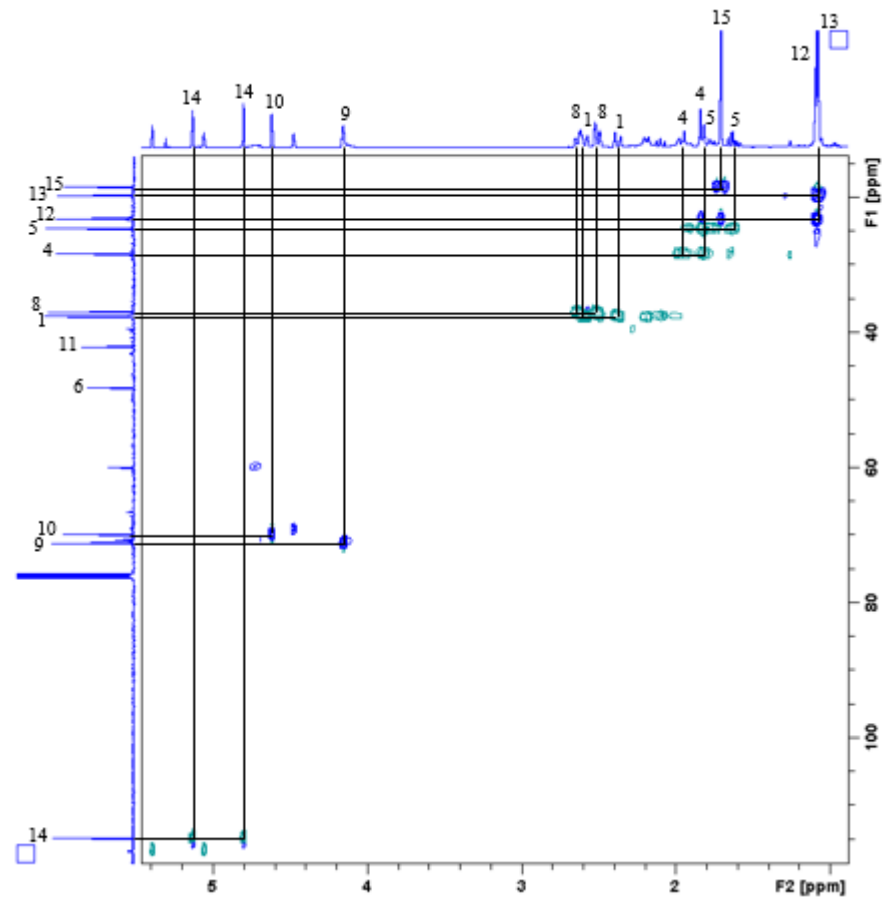


Figura 21: Espectro de RMN de HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) da substância isolada.

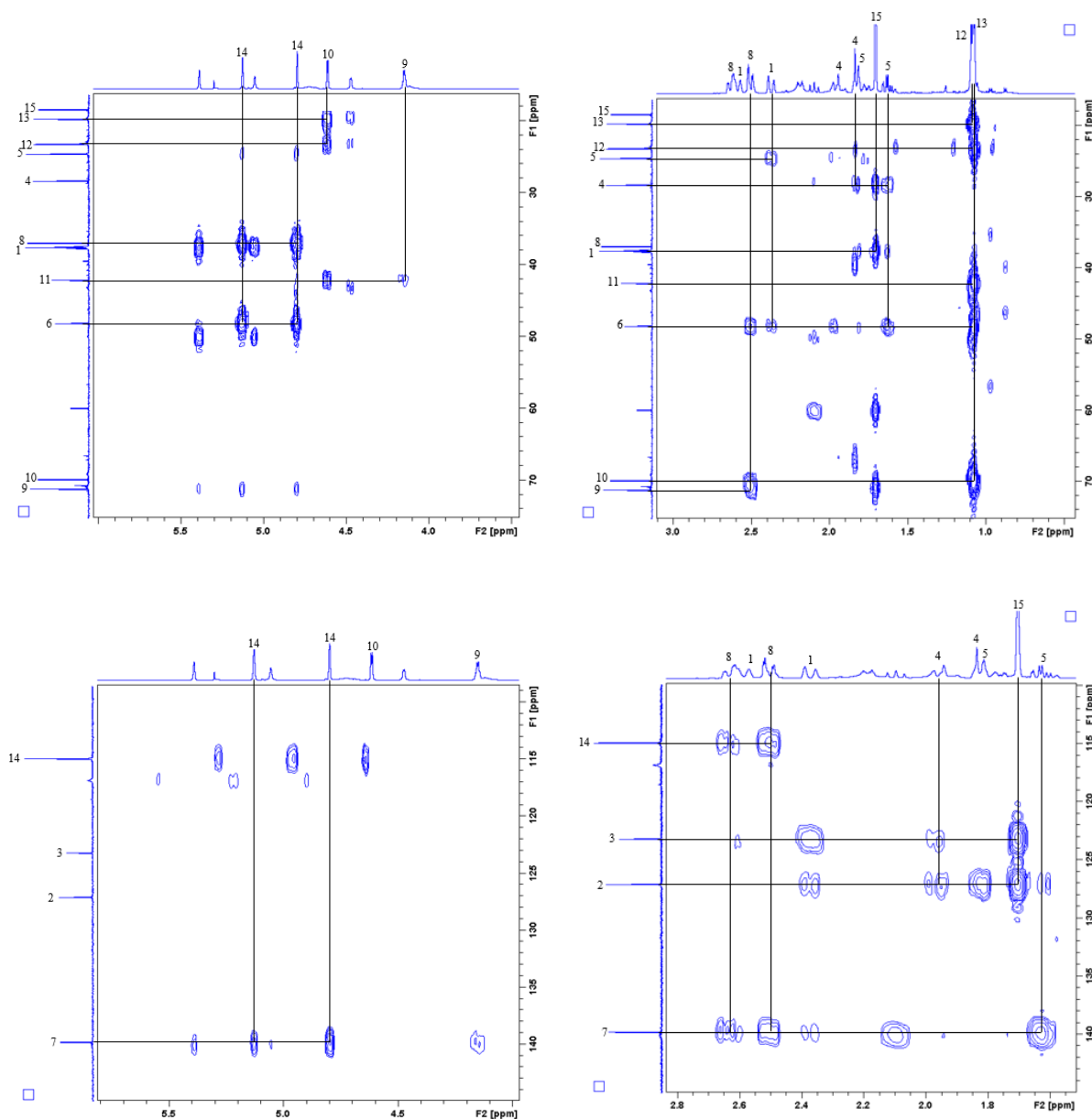


Figura 22: Espectro de RMN de HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) da substância isolada.

Aos hidrogênios de C-1 (δ 37,6 ppm) correspondem o duplete largo em δ 2,37 ppm e o singlete em δ 2,56 ppm. O multiplete em δ 1,96 ppm e o singlete em δ 1,83 ppm referem-se aos hidrogênios do C-4 (δ 28,3 ppm). Os multipletos em δ 1,64 e 1,81 ppm estão relacionados aos hidrogênios do C-5 (δ 24,6 ppm) e os multipletos em δ 2,49 e 2,63 ppm correspondem aos hidrogênios do C-8 (δ 37,0 ppm).

No espectro de HMBC, as correlações entre H-14 e C-8, C-6 e C-7 confirmam o posicionamento do grupo metílico na dupla ligação exocíclica da molécula. Os hidrogênios metilênicos H-8 apresentam correlação com C-6, C-7, C-9, C-10 e C-14 e a posição do carbono quaternário C-11 é confirmada pela sua correlação com os hidrogênios H-9, H-10, H-

12 e H-13 neste anel. O carbono quaternário C-6 tem sua posição entre os dois anéis confirmada pela sua correlação com os hidrogênios H-1, H-5, H-4, H-8, H-13 e H-14. As correlações dos hidrogênios H-15 com os carbonos C-3, C-2 e C-4 determinam a posição do grupo metílico no anel.

Esses dados estão de acordo com os descritos para o elatol (Figura 23), isolado anteriormente por König e Wright (1997), Lhullier *et al.* (2009), Wanke (2014) e Stein (2015) (Tabela 3).

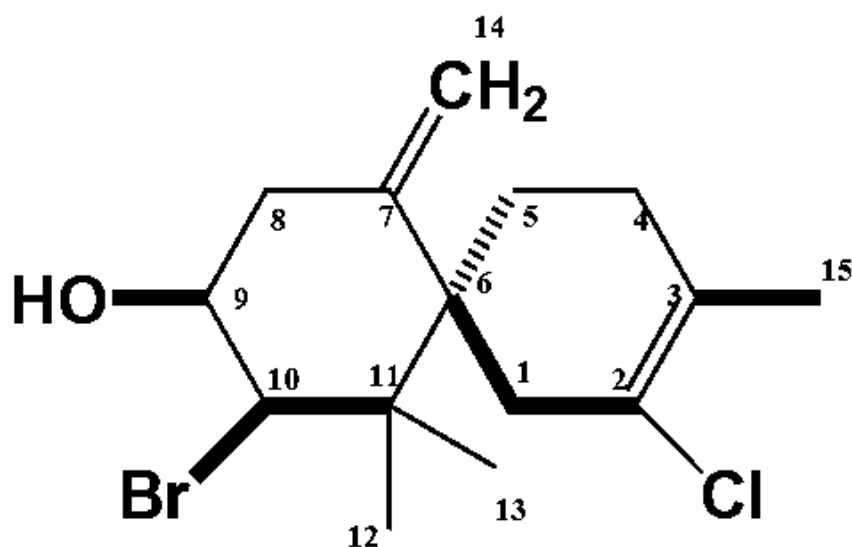


Figura 23: Estrutura química do elatol.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (δ em ppm) e ^1H (δ em ppm, multiplicidade J em Hz) do elatol (em CDCl_3 , 400 MHz) e comparação com a literatura.

	^{13}C (ppm)	$^{13}\text{C}^a$ (ppm)	$^{13}\text{C}^b$ (ppm)	$^{13}\text{C}^c$ (ppm)	^1H (J , Hz)	$^1\text{H}^a$ (J , Hz)	$^1\text{H}^b$ (J , Hz)	$^1\text{H}^c$ (J , Hz)
1	38,6	38,6	38,6	38,1	2,37 (d, 17,4) 2,56 (m)	2,08 (br d, 17,5) 2,19 (br d, 17,5)	2,38 (br d, 17,0) 2,59 (br d, 17,0)	2,36 (br d, 17,7) 2,56 (m)
2	128,0	128,0	124,2	128,1	-	-	-	-
3	124,1	124,1	128,1	124,1	-	-	-	-
4	29,3	29,3	29,4	29,3	1,83 (m) 196 (m)	1,82 (m) 1,96 (m)	1,81 (m) 1,95 (m)	1,84 (m) 1,96 (m)
5	25,6	25,6	25,6	25,6	1,64 (m) 1,81 (m)	1,62 (m) 1,80 (m)	1,63 (m) 1,82 (m)	1,64 (m) 1,81 (m)
6	49,1	49,1	49,2	49,1	-	-	-	-
7	140,8	140,7	140,8	140,7	-	-	-	-
8	38,0	38,0	38,0	38,0	2,49 (dd, 2,6; 14,5) 2,63 (m)	2,19 (dm, 14,4) 2,49 (dd, 2,8; 14,4)	2,50 (dd, 2,5; 14,6) 2,63 (d, 17,0)	2,50 (dd, 2,7; 14,5) 2,63 (dm, 14,5)
9	72,2	72,1	72,2	72,1	4,14 (q, 2,9; 6,2)	4,14 (m)	4,14 (br d 3,4)	4,15 (q, 3,0; 6,3)
10	70,9	70,8	70,9	70,9	4,61 (d, 2,9)	4,61 (d, 2,9)	4,61 (d, 2,6)	4,61 (d, 2,9)
11	43,1	43,1	43,1	43,1	-	-	-	-
12	20,7	20,7	20,8	20,7	1,06 (s)	1,06 (s)	1,07 (s)	1,07 (s)
13	24,2	24,2	24,3	24,2	1,07 (s)	1,07 (s)	1,08 (s)	1,08 (s)
14	115,9	115,8	115,9	115,9	4,79 (br s) 5,12 (br s)	4,79 (br s) 5,12 (br s)	4,79 (br s) 5,12 (br s)	4,80 (br s) 5,13 (br s)
15	19,4	19,4	19,5	19,4	1,70 (br s)	1,70 (br s)	1,70 (br s)	1,70 (br s)

^aKönig e Wright 1997 (^{13}C : 75,5 MHz, CDCl_3 ; ^1H : 300 MHz, CDCl_3). ^bLhullier *et al.* 2009 (125 MHz, CDCl_3). ^cStein 2015 (125 MHz, CDCl_3).

4.3.2 Identificação de compostos com potencial de atividade a partir de extratos brutos

Diversos compostos com potencial para serem os responsáveis pelas atividades moluscidas/cercaricidas das frações ativas foram denotados. As regiões em tempos de retenção de 864 a 980 s (par mz/TR 26 a 29), 1687 a 1705 s (114 a 136), 2146 a 2148 s (302 a 321), 2263 a 2264,5 s (374 a 381), 2672 a 2718 s (504 a 529), 2722 a 2725 s (532 a 545), 2850 a 2862 s (559 a 569), 3066 a 3078 s (610 a 639), 3182 a 3186 s (684 a 689) e 3593,25 a 3606 s (775 a 788) apresentam várias substâncias presentes em frações com 100% de atividade biológica que não estão presentes em frações sem atividade biológica (Figura 24). Assim, compostos presentes nessas regiões seriam os mais indicados para serem isolados por cromatografia sem a necessidade de um sub-fracionamento biomonitorado.

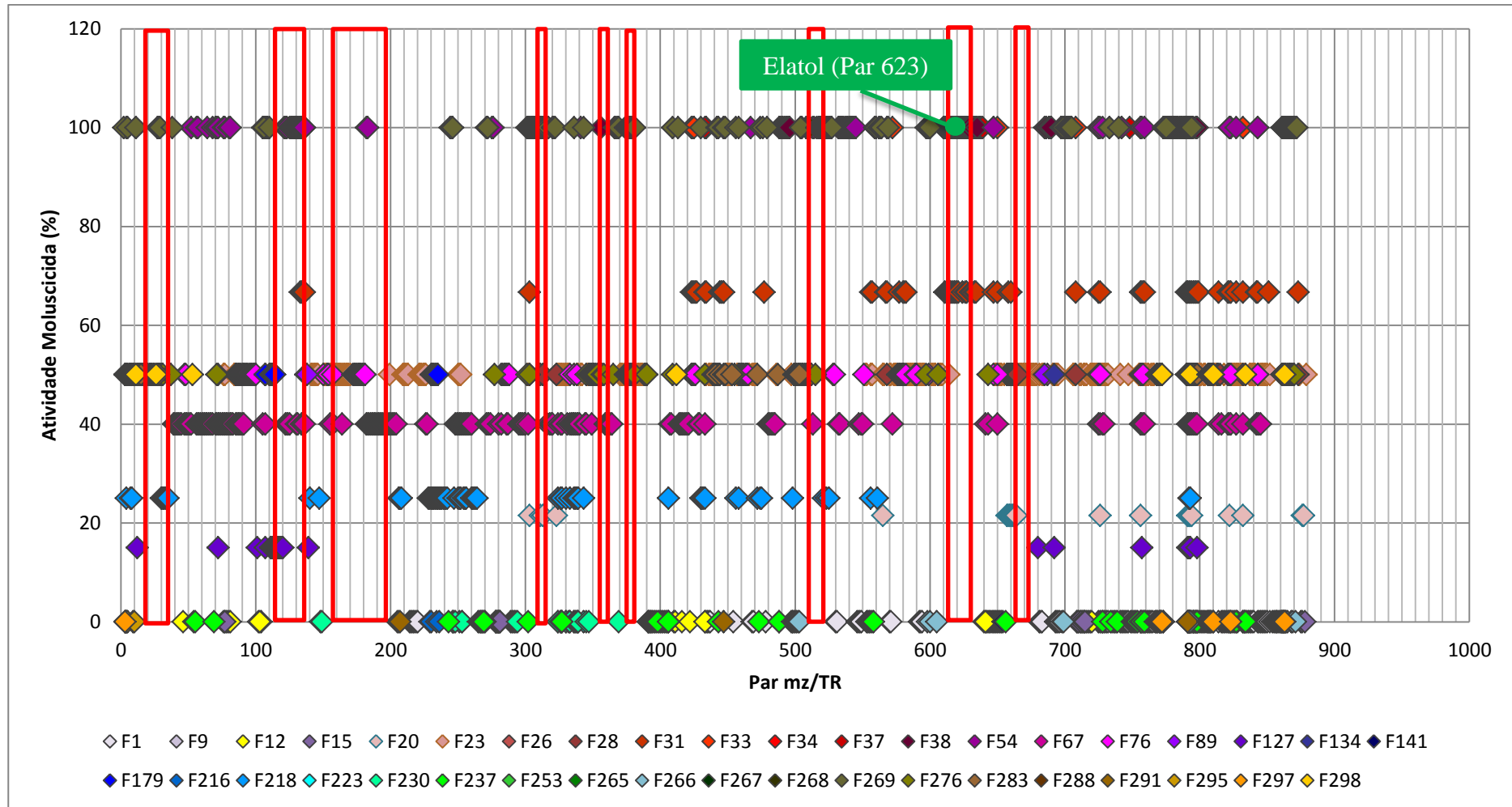


Figura 24: Relação entre os níveis de atividade moluscicida e os diferentes compostos denotados pelo par m/z/TR. Denotadas em vermelho estão regiões com pares m/z/TR com possibilidade de serem compostos responsáveis pela atividade biológica.

4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MOLUSCICIDA, CERCARICIDA E DA TOXICIDADE DO ELATOL

4.5.1 Atividade moluscicida do elatol em embriões de *B. glabrata*

O composto isolado apresentou 100% de letalidade em diferentes estádios embrionários de *B. glabrata* na concentração de 20 mg.L⁻¹, com respostas diferentes de acordo com o estágio embrionário. Para embriões em estágio blástula, a mínima concentração requerida para obter-se 100% de mortalidade foi observada em 1,56 mg.L⁻¹; já para indivíduos em estágio véliger, a concentração foi de 6,25 mg.L⁻¹. Em concentrações abaixo de 12,5 até 6,25 mg.L⁻¹, indivíduos em estágio véliger ainda sobreviviam após 24 h de exposição, porém após 48 h, foi confirmada a mortalidade de todos os animais expostos. Diferentemente do que fora observado em véliger, para os indivíduos em estágio blástula expostos a concentrações 100% letais, todas foram efetivas em 24 h de exposição.

Para determinar os valores de CL50 e CL90, o elatol foi avaliado em diferentes concentrações decrescentes para que fossem detectadas taxas de mortalidade inferiores a 100%, gerando diferentes curvas de CL para os diferentes estádios (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade moluscicida em embriões em diferentes estádios de *B. glabrata* de elatol isolado de *L. dendroidea*.

Embriões			
Estádio	Concentração (mg.L⁻¹)	Nº de embriões	Nº de mortos (%)
Blástula	0*	216	0 (0)
	0,2	170	0 (0)
	0,3	173	41 (23,70)
	0,4	159	65 (40,88)
	0,5	157	71 (45,22)
	0,6	154	79 (51,30)
	0,7	169	110 (65,09)
	0,8	152	114 (75,00)
	1,56	170	170 (100)
Véliger	0*	215	0 (0)
	2,35	158	4 (2,53)
	2,74	204	23 (11,27)
	3,13	190	24 (12,63)
	3,93	185	56 (30,27)
	4,20	199	104 (52,26)
	4,70	175	101 (57,71)
	4,90	196	122 (62,24)
	5,10	179	122 (68,16)
	5,50	177	129 (72,88)
	5,90	178	155 (87,08)
6,25	155	155 (100)	

0* = Controle negativo – DMSO 1,5%

Tabela 5: Valores das concentrações letais a 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) dos indivíduos de *B. glabrata* em estádios embrionários expostos ao elatol.

Concentração letal	Estádios embrionários	
	Blástula	Véliger
CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	0,55 [0,47-0,63]	4,52 [4,23-4,78]
CL ₉₀ (mg.L ⁻¹)	1,08 [0,99-1,16]	6,12 [5,95-6,27]

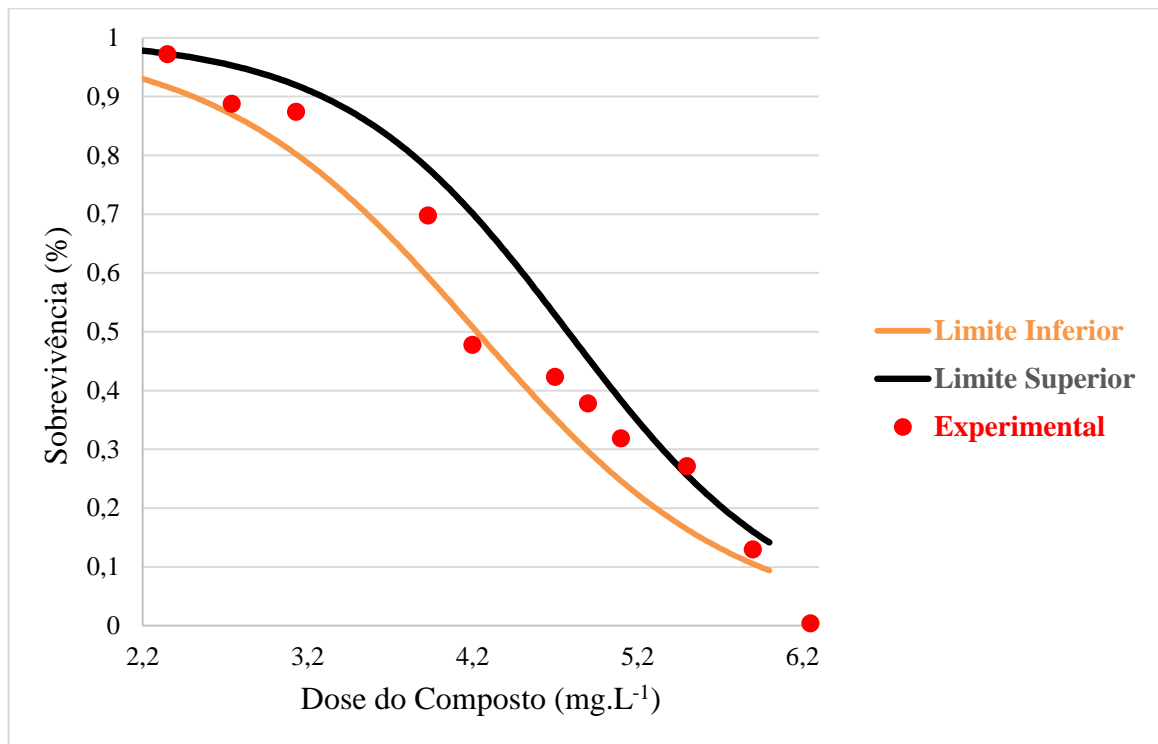


Figura 25: Curva dose-resposta de sobrevivência de embriões de *B. glabrata* em estágio véliger expostos ao elatol.

O elatol foi de seis a sete vezes mais ativo em embriões em estágio blástula que em véliger. Quando expostos a concentrações inferiores às 100% letais, os embriões apresentaram malformações que acarretaram em mortes ao longo do tempo de avaliação do ensaio.

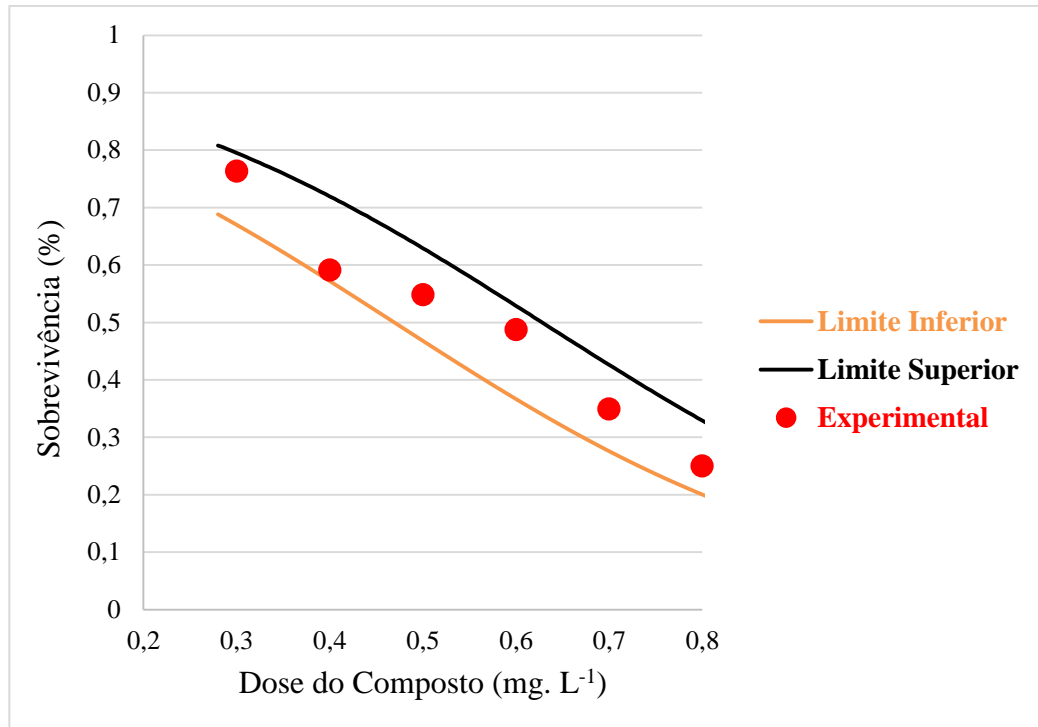


Figura 26: Curva dose-resposta de sobrevivência de embriões de *B. glabrata* em estágio blástula expostos ao elatol.

4.5.2 Atividade cercaricida do elatol em cercarias de *S. mansoni*

Cercárias de *S. mansoni* foram expostas ao elatol em concentrações de 0,80 a 100 mg.L⁻¹. Foi observada a morte de todos os indivíduos expostos a soluções nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg.L⁻¹. Mais de 50% dos animais expostos a solução em 6,25 mg.L⁻¹ apresentaram uma paralisia temporária, contudo, após 15 min de exposição alguns indivíduos voltaram a apresentar motilidade, até que ao fim dos 120 min de exposição, apenas 20% dos animais remaneceram sem movimento no fundo da placa. Concentrações inferiores a 6,25 mg.L⁻¹ apresentaram baixíssima ou nenhuma atividade, onde as cercárias permaneceram vivas e com movimentação semelhante aos grupos controle (DMSO 1,5% e água). Para os animais cuja falta de motilidade fora confirmada, ainda foi possível visualizar a separação da cauda da cabeça. Não foram detectadas alterações morfológicas externas no animal em relação ao grupo controle.

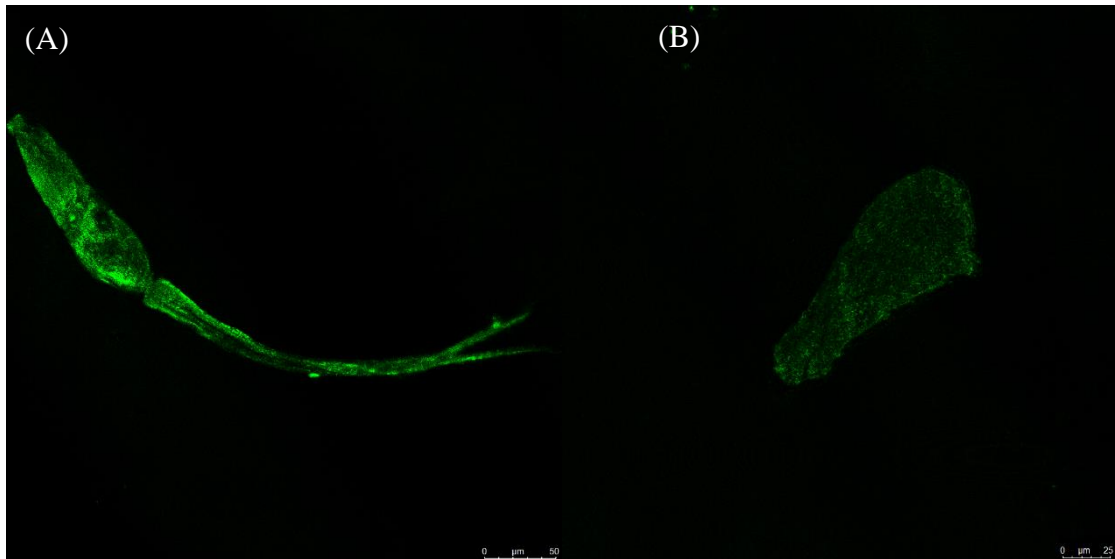


Figura 27: Cercárias de *S. mansoni*: (A) indivíduo do grupo controle em meio aquoso; (B) cabeça do indivíduo exposto a elatol na concentração de 25 mg.L⁻¹. Imagens obtidas em microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss).

4.5.3 Avaliação da toxicidade do elatol

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.5. Após 48 h de exposição, todos os organismos submetidos ao teste encontravam-se imóveis no fundo da coluna d'água em ambas as concentrações testadas. Contudo, após 24 h de exposição à concentração de 0,6 mg.L⁻¹, ainda haviam animais vivos (3 de 20), indicando um menor grau de toxicidade.

Segundo a NBR 12713, o elatol é classificado como uma substância tóxica. A Associação Brasileira de Indústria Química (ABIQUM) (2005) categoriza a toxicidade como aguda I, pois apresenta efeito tóxico aos animais quando expostos a solução em concentração inferior a 1 mg.L⁻¹.

Tabela 6: Mortalidade de *Daphnia similis* expostas a elatol isolado no presente estudo e dados de niclosamida da literatura.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Mortalidade
Elatol	
0*	0 (0)
0,6	20 (100)
6,0	20 (100)
Niclosamida ¹	
0*	0 (0)
0,1	0 (0)
0,2	20 (100)

0* = Controle negativo – DMSO 1,5% em água.

¹ = Rapado (2012).

4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MOLUSCICIDA, CERCARICIDA E DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS ANÁLOGOS DO ELATOL

4.6.1 Atividade moluscicida do obtusol e iso-obtusol

Os compostos análogos apresentaram 100% de letalidade em diferentes estádios embrionários de *B. glabrata* na concentração de 25 mg.L⁻¹.

Tabela 7: Atividade moluscicida do obtusol e iso-obtusol em embriões em diferentes estádios de desenvolvimento de *B. glabrata*.

Composto	Estádio	Concentração (mg.L ⁻¹)	Embriões	
			Nº de embriões	Nº de mortos (%)
Obtusol	Blástula	0*	165	0 (0)
		25	166	166 (100)
	Véliger	0*	161	0 (0)
		25	171	171 (100)
Iso-Obtusol	Blástula	0*	165	0 (0)
		25	168	168 (100)
	Véliger	0*	161	0 (0)
		25	173	173 (100)

0* = Controle negativo – DMSO 1,5%

4.6.2 Atividade cercaricida do obtusol e do iso-obtusol

Cercárias de *S. mansoni* foram expostas ao obtusol e ao iso-obtusol em concentração de 25 mg.L⁻¹. Foi observada a morte de todos os indivíduos expostos a soluções logo nos primeiros 5 min de exposição. Da mesma forma que nos animais expostos ao elatol, nos indivíduos cuja morte fora confirmada, também fora visualizada a separação da cabeça e da cauda (Figura 28 A e B). Não foram identificadas alterações morfológicas externas em relação ao grupo controle.

Nos grupos controle 96% (água) e 95% (DMSO 1,5%), as cercárias permaneceram vivas e com movimentação considerada normal ao longo de todo o tempo de exposição.

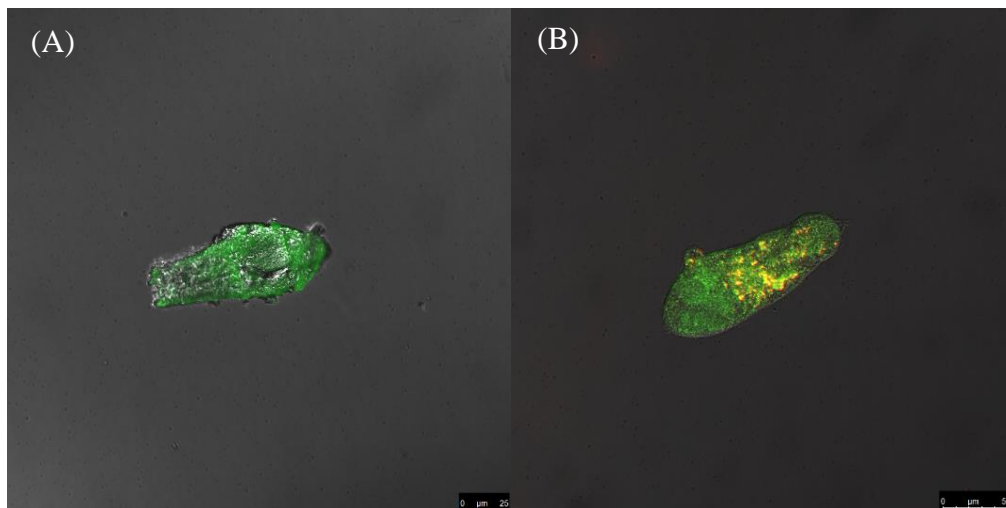


Figura 28: Cabeça da cercária de *S. mansoni* exposta a (A) iso-obtusol e (B) obtusol na concentração de 25 mg.L⁻¹. Imagem obtida em microscópio confocal (LSM 510 META, Zeiss).

4.6.3 Toxicidade do obtusol e iso-obtusol

A tabela 8 apresenta os resultados da toxicidade aguda determinada para as soluções de obtusol e iso-obtusol, realizada conforme descrito no item 3.5. Após 48 h de exposição todos os organismos submetidos ao teste encontravam-se imóveis no fundo da coluna d'água. Conforme a NBR 12713, ambas as substâncias são consideradas tóxicas, pois acarretam na mortalidade dos organismos expostos. Segundo a ABIQUIM (2005), ambos são categorizados como toxicidade aguda II, pois apresentam toxicidade em concentrações entre 1 e 10 mg.L⁻¹.

Tabela 8: Mortalidade de *Daphnia similis* expostas a obtusol, iso-obtusol e niclosamida.

Composto	Concentração (mg.L⁻¹)	Mortalidade
Obtusol	0*	0 (0)
	6,0	20 (100)
Iso-Obtusol	0*	0 (0)
	6,0	20 (100)
Niclosamida ¹	0*	0 (0)
	0,1	0 (0)
	0,2	20 (100)

0* = Controle negativo – DMSO 1,5%

¹ = Dados obtidos de Rapado (2012).

5 DISCUSSÃO

A busca por compostos de origem algal ativos tanto no hospedeiro *Biomphalaria glabrata* quanto na fase aquática de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* como uma possível alternativa para o controle da esquistossomose em locais endêmicos é de interesse recente (GUEDES *et al.*, 2014; SAAD *et al.*, 2018), uma vez que não eram consideradas fonte de compostos com tal atividade biológica, característica esta que sempre fora associada as espécies vegetais terrestres (ALADESANMI, 2007; RAPADO, 2012; ROCHA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014). Com tal interesse em foco, o Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas da Universidade de São Paulo iniciou em 2013 a procura por espécies algais que apresentem atividade a fim de bioprospectar compostos que confirmem tal atividade. Espécies de algas dos filos Rhodophyta e Ochrophyta tiveram a atividade moluscicida e esquistossomicida de seus extratos avaliadas, em que espécies de *Laurencia* se mostraram promissoras.

O gênero *Laurencia* pode ser considerado um dos gêneros de algas marinhas mais estudados no mundo, tendo diversos constituintes químicos identificados desde a década de 60 (IRIE *et al.*, 1969^a, 1969b, 1970; SIMS *et al.*, 1974). No Brasil, *Laurencia dendroidea* é a espécie mais estudada em função de sua ocorrência ao longo de parte do litoral brasileiro. Dela são isolados sesquiterpenos tipo chamigrano, os quais têm como característica a presença de ligações duplas exocíclicas onde o bromo pode ser um dos ligantes, caracterizando uma halogenação diferencial das espécies de algas marinhas. Pertencente a essa classe de sesquiterpenos está o elatol, um dos componentes majoritários e metabólito mais estudado dessa espécie (PEREIRA; TEIXEIRA, 1998).

Apesar da vasta quantidade de informação referente às atividades biológicas de extratos e compostos de *Laurencia dendroidea* (ANGGADIREDJA *et al.*, 1997; SHANMUGAM; MODY, 2000; VAIRAPPAN, 2003; LEE *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012), pouco se sabe sobre a atividade dessa espécie no combate à esquistossomose, tendo a co-orientadora do presente trabalho estudado pela primeira vez a atividade do extrato e do elatol em vermes adultos de *S. mansoni* (STEIN, 2015) e, posteriormente, em embriões de *B. glabrata*. Assim sendo, optou-se pela metodologia de fracionamento biomonitorado para o estudo da atividade moluscicida e cercaricida, com a intenção de promover maior alcance na busca por compostos potencialmente ativos.

Tal metodologia encaixa-se na escolha pela *Laurencia dendroidea*, uma vez que essa espécie tem grande potencial na descoberta de novos compostos, possuindo grande variedade e de metabólitos com atividades biológicas já confirmadas na literatura. O que fora refletido

em testes prévios em nosso laboratório e na atividade moluscicida dos extratos de *L. dendroidea* realizados nesse trabalho. A atividade biológica detectada foi promissora, uma vez que ensaios com outras espécies do gênero *Laurencia* realizados em nosso laboratório apresentaram atividade moluscicida em tempos de exposição semelhantes. Extratos de *L. aldingensis* em diclorometano e hexano a 100 mg.L^{-1} causaram a mesma mortalidade no mesmo tempo de exposição (24 h), nos mesmos estádios (blástula e véliger), porém, o extrato dessa espécie em metanol não apresentou atividade. Comparados aos extratos metanólicos das outras espécies de *Laurencia*, o extrato de *L. dendroidea* foi o mais ativo.

Através da avaliação do perfil cromatográfico em CG-EM dos extratos em éter de petróleo, em diclorometano e em metanol, diversas substâncias foram detectadas, confirmando o exposto na literatura para a espécie. Entre elas, presentes majoritariamente em todos os extratos, o elatol e o isoobtusol. Ambas as substâncias foram identificadas com baixo índice de similaridade uma vez que as bibliotecas disponíveis as tem na forma de acetato. Entretanto, ao trabalhar-se com o extrato em diclorometano que apresentou a maior quantidade de compostos voláteis (220), e, portanto, foi o eleito para fracionamento, gerando 39 frações, teve uma delas caracterizada por RMN como elatol puro, confirmando o que fora inicialmente detectado pela análise por CG-EM.

O elatol já havia sido identificado e isolado em *L. dendroidea* e descritas atividades antiparasitárias. Apresentou atividade contra *Leishmania amazonensis* após 72 h de incubação, com IC_{50} de $4,0 \text{ } \mu\text{M}$ e $0,45 \text{ } \mu\text{M}$ para as formas promastigota e amastigota intracelular, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2010). Mais recentemente, Machado *et al.* (2011) reportou valores de IC_{50} maiores para o mesmo período de incubação, para promastigotas $18,6 \text{ } \mu\text{M}$ e para amastigotas $11,7 \text{ } \mu\text{M}$. Testado também quanto ao potencial anti-tripanosoma, apresentou efeito contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com valores de IC_{50} de $45,4 \text{ } \mu\text{M}$, $1,38 \text{ } \mu\text{M}$ e $1,01 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2009). Entretanto, ao testar o elatol na concentração de $149 \text{ } \mu\text{M}$ (50 mg.L^{-1}), Stein (2015) não detectou nenhuma atividade sobre a forma adulta de *S. mansoni*.

No presente estudo o elatol apresentou atividade na forma de vida livre aquática do parasita (cercária), em concentração de $37,5 \text{ } \mu\text{M}$ ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$), inferior à testada por Stein (2015) na forma adulta. Nessa concentração a motilidade de todos os animais expostos foi interrompida. A diferença de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* já fora descrita para outros compostos, como o praziquantel, oxamniquine e artemeter, além da piplartina de origem vegetal (UTZINGER *et al.*, 2003; ARAGÓN *et al.*,

2009; VERAS *et al.*, 2012); porém, até o presente momento, não há estudos que descrevam os mecanismos envolvidos na diferença de sensibilidade. Diversos autores pressupõem que as mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do parasita podem estar relacionadas a tal diferença (KUSEL; GORDON, 1989; SKELLY; ALAN WILSON, 2006).

O elatol também apresentou atividade moluscicida em baixas concentrações, devido a maior sensibilidade dos indivíduos em fase inicial de formação e em ambos os estádios, blástula (CL_{50} 1,65 μ M | 0,55 $mg.L^{-1}$) e véliger (CL_{50} 13,5 μ M | 4,52 $mg.L^{-1}$), sendo ativo em concentrações recomendadas pela OMS para um moluscicida de origem vegetal. Esse resultado se mostra promissor, uma vez que apresenta um composto com atividade ainda maior que cetonas isoladas por Rapado (2015), como a 2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona cujas CL_{90} são de 14,12 e 14,87 $mg.L^{-1}$ para blástula e véliger, respectivamente. Também fora mais efetivo que o ácido úsnico testado por Martins *et al.* (2014) cuja CL_{50} para blástula é de 0,92 $mg.L^{-1}$.

No perfil cromatográfico do extrato bruto de *L. dendroidea* em diclorometano também estava presente, em grande quantidade, o iso-obtusol, também isolado por Stein *et al.* (2015), metabólito secundário mais abundante na espécie depois do elatol e composto análogo a ele, diferindo-se pela presença de um bromo a mais em um dos anéis aromáticos que compõem a estrutura. Por se tratar de uma substância produzida em grande quantidade pela alga e por dispormos dela já isolada em nosso laboratório devido à parceria com a Dr^a Miriam Falkenberg e Dr^a Lilian Sibelle Campos Bernardes do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina, o iso-obtusol também teve suas atividades moluscicida e cercaricida avaliadas. Da mesma forma, o obtusol, composto que difere do iso-obtusol pela rotação de um dos anéis aromáticos, também teve suas atividades avaliadas.

Testados em concentração única de 25 $mg.L^{-1}$, conforme explanado no item 3.4.3, tanto o obtusol quanto o iso-obtusol foram efetivos em eliminar 100% dos embriões de *B. glabrata* e cercárias de *S. mansoni* nos menores tempos de exposição, 24 h e 5 min, respectivamente. Respostas em baixos tempos de exposição são desejadas, pois significam que o composto interfere rapidamente no desenvolvimento do animal e/ou interrompendo suas funções vitais. Há de se ressaltar a atividade do iso-obtusol também no estágio adulto do *S. mansoni*, identificada por Stein (2015), tornando-o um composto de grande interesse devido ao potencial em exercer atividade sobre fases de desenvolvimento do parasita em diferentes habitats (meio aquático para as cercárias e sanguíneo para o esquistossoma).

A atividade em embriões de caramujos é de grande importância, pois significa que o composto consegue ultrapassar a membrana e a cápsula do ovo, além da massa gelatinosa, barreiras que protegem e envolvem o embrião na desova. As desovas encapsuladas são envolvidas por secreções produzidas por glândulas mucíparas e da ooteca para formar a massa dos ovos que é oviposta pelo caramujo no ambiente aquático. Segundo Hathaway *et al.* (2010) as proteínas que compõem a massa dos ovos possuem atividade microbicida e protegem os embriões no interior das desovas da ação de bactérias, fungos e outros patógenos. Contudo, o papel da desova e seus constituintes na proteção à exposição a compostos químicos ainda requer estudos.

O mecanismo de ação de moluscidas também não é bem conhecido, e, mesmo com relação à niclosamida, que está em uso desde a década de 80, não há um mecanismo de ação determinado. Especula-se que a morte dos caramujos expostos a compostos químicos ocorra devido a alterações fisiológicas, como a redução nos batimentos cardíacos e inchaço de tecidos devido a alterações nos níveis de líquido intracelular (WHO, 1983; DUNCAN, 1985).

Em função dos altos níveis de atividade apresentados pelo elatol, obtusol e iso-obtusol, foi avaliada a toxicidade dos compostos em *D. similis*. Todos os compostos foram classificados como tóxicos, o que não inviabiliza sua utilização, uma vez que a niclosamida, considerada muito tóxica sob os mesmos critérios de avaliação, é utilizada em locais endêmicos como moluscida para controle da transmissão da esquistossomose até o presente (ANDREWS; THYSSEN; LORKET, 1983; WHO, 1993).

Assim, a procura por outros compostos com a requerida atividade biológica continua, podendo prosseguir de diferentes formas, dentre elas: a metodologia de fracionamento biomonitorado, explanada no item 3.4, empregada até o momento. Segundo Hostettmann e Marston (1997) o monitoramento da atividade biológica e das frações obtidas é indicado por possibilitar o direcionamento das operações de fracionamento para o isolamento dos compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos. Entretanto, apesar de efetiva, essa é uma metodologia dispendiosa, onde cada fração obtida passa por uma etapa de análise cromatográfica, de testes de atividade biológica e posterior sub-fracionamento, até que um composto puro seja obtido. Com o intuito de usar de forma mais eficiente os dados obtidos após o primeiro fracionamento, o presente trabalho fez uso de metodologias usualmente empregadas em estudos metabolômicos (KALOGEROPOULOU, 2011; CRUZ, 2017).

A sobreposição dos dados tratados e agrupados pelo XCMS com os dados de atividade biológica, sem que houvesse uma análise de correlação, apontou 20 regiões onde

encontram-se aproximadamente 181 pares mz/TR com potencial de representarem compostos ativos (Figura 24). Tais pares, em sua grande maioria, não indicam qual composto representam, uma vez que as bibliotecas para compostos oriundos de extratos algais ainda são muito limitadas, diferentemente do que ocorre com os extratos de espécies vegetais, o que também dificulta a implementação completa da metodologia de metabolômica sobre todos os compostos presentes nas frações.

A cromatografia gasosa, com sua elevada sensibilidade, gera uma grande quantidade de picos que não necessariamente representam metabólitos, mas sim isótopos, fragmentos e variações químicas gerados durante o processo de ionização. Cada metabólito real pode gerar dezenas de picos correspondentes a moléculas derivadas, o que aumenta a complexidade dos dados e, conseqüentemente, de seu tratamento analítico (SCHELTEMA et al., 2009). Dessa forma, o presente modelo ainda requer etapas de filtragem que permitam ao modelo determinar com maior precisão os metabólitos responsáveis pelas atividades desejadas.

Caso validado, este protocolo reduziria consideravelmente os gastos com reagentes e o número de animais utilizados para a procura de compostos ativos, reduzindo a um fracionamento único do extrato bruto, caracterização das frações por CG-EM e de sua atividade biológica, tratamento dos dados, isolamento do composto em potencial por cromatografia, identificação e/ou confirmação do composto por RMN e teste final de atividade.

Uma possibilidade para a redução da toxicidade se dá através de modificações na molécula do composto ativo. Pois, apesar das atividades descritas anteriormente, os mecanismos de ação do elatol, obtusol e iso-obtusol não foram elucidados em nenhum dos modelos biológicos testados. Em estudos recentes em parceria com o Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, derivados do elatol e do iso-obtusol estão sendo desenvolvidos, a fim de determinar quais grupos funcionais são responsáveis pela atividade moluscicida e cercaricida, bem como os que influenciam na indução de toxicidade a outros organismos. Espera-se, assim, que os testes com derivados abram caminho para um melhor entendimento das relações entre estrutura química e atividade biológica desses sesquiterpenos.

6 CONCLUSÕES

Os extratos em éter de petróleo, diclorometano e metanol de *L. dendroidea* apresentaram forte atividade moluscicida em todos os estádios expostos, acarretando na morte dos animais no menor tempo de exposição avaliado.

O fracionamento biomonitorado da atividade moluscicida em *B. glabrata* de *L. dendroidea* resultou no isolamento de um composto ativo: elatol, confirmando essa espécie de alga marinha como promissora na busca por compostos com atividade moluscicida.

O elatol é um composto de grande potencial no controle da esquistossomose, pois apresenta atividade moluscicida e cercaricida em concentrações abaixo das recomendadas pela OMS e nos menores tempos de exposição, com valores de CL50 de $0,55 \pm 0,08$ e $4,52 \pm 0,29$ mg.L⁻¹, e de CL90 de $1,08 \pm 0,09$ e $6,12 \pm 0,17$ mg.L⁻¹ para blástula e véliger respectivamente.

O elatol foi considerado tóxico ao ter sua toxicidade avaliada em *D. similis*, contudo, modificações estruturais já estão sendo realizadas a fim de elucidar o mecanismo de ação, reduzir a toxicidade e melhorar a atividade moluscicida e cercaricida.

A fim de otimizar o fracionamento biomonitorado, integrou-se ao presente estudo, análises de metabolômica, que possibilitará a identificação de possíveis compostos ativos sem a necessidade de uma nova etapa de subfracionamento e avaliação de atividade moluscicida, caso as análises de correlação verifiquem essa hipótese. Se validada, a metodologia terá grande impacto na redução de custos e de animais utilizados para o isolamento e identificação de compostos com atividade biológica.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Propõe-se como continuidade deste trabalho:

- Validação do modelo proposto através do isolamento de um dos compostos denotados pelo modelo e confirmação de sua atividade biológica, e através de análise multivariada dos dados obtidos;
- Avaliar a atividade do iso-obtusol nas demais formas do *S. mansoni*, uma vez que esse apresentou atividade em cercarias e vermes adultos.
- Elaborar mais derivados do elatol, obtusol e iso-obtusol, para melhor elucidar os mecanismos de ação e toxicidade dessas substâncias;

BIBLIOGRAFIA

- ALBUQUERQUE, I. R. L.; QUEIROZ, K. C. S.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 167-171, 2004.
- AMARAL, L. F.; MORIEL, P.; FOGGLIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. Evaluation of the cytotoxicity and phototoxicity of *Caryocar brasiliense* supercritical carbon dioxide extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 450, 2014.
- ANDREGUETTI, D. X. **Prospecção de bioativos farmacológicos em algas marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade**. 2015. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANDREWS, P.; THYSSEN, J.; LORKE, D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 245-295, 1983.
- ANGGADIREDJA, J.; ANDYANI, R.; HAYATI; MUAWANAH. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p.477, 1997.
- ARAGÓN, A. D.; IMANI, R. A.; BLACKBURN, V. R.; CUPIT, P. M.; MELMAN, S. D.; GORONGA, T.; WEBB, T.; LOKER, E. S.; CUNNINGHAM, C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, p. 57-65, 2009.
- ARAÚJO, N. **Associação de fármacos na terapêutica experimental da esquistossomose mansoni**. 2010. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.
- ATHUKORALA, Y.; LEE, K.; KIM, S.; JEON, Y. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1711-1716, 2007.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 266-268, 1995.
- BARBOSA, J. P.; PEREIRA, R. C.; ABRANTES, J. L.; SANTOS, C. C. C. D.; REBELLO, M. A.; PAIXÃO, I. C. P.; TEIXEIRA, V. L. In vitro antiviral diterpenes from Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii*. **Planta Med**, v. 70, p. 856 - 860, 2004.
- BEZERRA, J. C. B., SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.
- BIANCO, E. M.; PIRES, L.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; REIS, T. N. V.; VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; COCENTINO, A. L. M.; NAVARRO, D. M. A. F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene

against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 270, 2013.

BOSSARD, E. Angolan medicinal plants used also as piscicides and/or soaps. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40 (1), p. 1-19, 1993.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. **Série A. Normas e manuais técnicos**, p. 816-816, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4 ed, 2014.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J.; WATTS, S. **The social context of schistosomiasis and its control**. Special Program for Research & Training in Tropical Diseases - World Health Organization, Suíça, 2008.

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2031-2317, 2010.

CAMARGO, E. P. Doenças tropicais. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 95-110, 2008.

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

CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. **Série Esquistossomose**, n. 6, 2004.

CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 1124, 2008.

CASTELLO, G.; GERBINO, T. C. Effect of temperature on the gas chromatographic separation of halogenated compounds on polar and non-polar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 437, p. 33-45, 1988.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Epidemiology and risk factors**. Global Health Division of Parasitic Diseases, Parasites, Schistosomaesiasis, 2012. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/epi.html>>. Acesso em: 05/04/2018.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. S3-S9, 2003.

COLL, J.; SKELTON, B.W.; WHITE, A.H.; WRIGHT, A.D. Tropical Marine Algae. V. The structure determination of two novel sesquiterpenes from the red alga *Laurencia tenera* (*Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae*). **Australian Journal of Chemistry**, v. 42, p. 1695-1703, 1989.

CREED, M.; FUJII, M. T.; BARRETO, M. B.; GUIMARÃES, S. M. P. B.; CASSANO, V.; PEREIRA, S. M. B.; CARVALHO, M. F. O.; KHANDER, S. *Rhodophyceae*. In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 1, p. 416-436, 2010.

CRUZ, P. L. R. **Avaliação de terapias imunossupressoras em transplantes renais com uma abordagem metabolômica**. 2017. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; CARVALHO, A. G. V.; COUTINHO, R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. **Biofouling**, v. 18, p. 13-20, 2002.

DAVIS, A.; BILES, J. E.; ULRICH, A. M. Initial experiencens with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma haematobium*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, p. 773-779, 1979.

DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRU, A. W.; SALDANA, J.; DOMINGUEZ, L.; COLL, J.; FUJII, M. T.; MANTA, E. New sesquiterpenes derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination, and anthelmintic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1552-1555, 2001.

DEMIREL, Z.; YILMAZ-KOZ, F. F.; KARABAY-YAVASOGLU, U. N.; OZDEMIR, G.; SUKATAR, A. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from Aegean Sea. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n. 6, p. 619-628, 2009.

DE OLIVEIRA, S. K.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; MASCARELLO, A.; VELEIRINHO, B.; RAMLOV, F.; KUHNEN, S.; YUNES, R. A.; MARASCHIN, M. From bench to bedside: natural products and analogs for the treatment of neglected tropical diseases (ntds). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 44, p. 33-92, 2015.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 51-78, 2006.

DIAS, T.; BRITO, I.; MOUJIR, L.; PAIZ, N.; DARIAS, J.; CUETO, M. Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1677, 2005.

DOS SANTOS, A. F.; AZEVEDO, D. P. L.; MATA, R. C. S.; MENDONÇA, D. I. M. D.; SANT'ANA, A. E. G. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 135-139, 2007.

DOS SANTOS, V.; LEITE, K.; DA COSTA SIQUEIRA, M.; REGASINI, L.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C.; GALUPPO, M.; STOLF, B.; PEREIRA, A.; CICALI, R.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (*Celastraceae*). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.

DUNCAN, J. The toxicology of plants molluscicides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 243-264, 1985.

FAGGIO, C.; PAGANO, M.; DOTTORE, A.; GENOVESE, G.; MORABITO, M. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. **Natural Product Research**, v. 30, ed. 17, p. 1934-1937, 2016.

FENG, M. T.; YU, X. Q.; YANG, P.; YANG, H.; LIN, K.; MAO, S. C. Two new antifungal polyunsaturated fatty acidethyl esters from the red alga *Laurencia okamurai*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, p. 418-422, 2015.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

FUJII M. T.; CASSANO, V.; STEIN E. M.; CARVALHO L. R. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the Laurencia complex (*Ceramiales*, *Rhodophyta*) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 268-282, 2011.

FUJII, M. T.; GUIMARÃES, S. M. P. B.; GURGEL, C. F. D.; FREDERICQ, S. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (*Rhodomelaceae*, *Ceramiales*) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. **Phycologia**, v. 45, p. 432-441, 2006.

GUEDES, E. A. C.; CARVALHO, C. M.; RIBEIRO JUNIOR, K. A. L.; RIBEIRO, T. F. L.; BARROS, L. D.; LIMA, M. R. F.; MOURA, F. B. P.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* and molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian marine algae. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, Irlanda, 2018. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 13/04/2018.

HAMMAMI, H.; MEZGHANI-JARRAYA, R.; DAMAK, M.; AYADI, A. Molluscicidal activity of various solvent extracts from *Solanum nigrum* var. *villosum* L. aerial parts against *Galba truncatula*. **Parasite**, v. 18, n. 1, p. 63-70, 2011.

HATHAWAY, J. J.; ADEMA, C. M.; STOUT, B. A.; MOBARAK, C. D.; LOKER, E. S. Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (gastropoda, mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, p. 425-435, 2010.

HEO, S.; PARK, E.; LEE, K.; JEON, Y. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1613-1623, 2005.

HEO, S., YOON, W., KIM, K., AHN, G., KANG, S., KANG, D., ABUAFFAN, OH, C., JUNG, W., JEON, Y. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.8-9, p. 2045-2051, 2010.

HOSTETTMANN, K. The use of plant-derived compounds for the control of schistosomiasis. **Naturwissenschaften**, v. 71, p. 347-351, 1984.

IRIE, T.; SUZUKI, M.; HAYAKAWA, Y. Isolation of aplysin, debromoaplysin, and aplysinol from *Laurencia okamurai* Yamada. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 42, p. 843-844, 1969a.

IRIE, T.; SUZUKI, M.; YASUNARI, Y.; KUROSAWA, E.; MASAMUNE, T. Laurene, a sesquiterpene hydrocarbon from *Laurencia* species. **Tetrahedron**, v. 25, p. 459-468, 1969b.

IRIE, T.; SUZUKI, M.; KUROSAWA, E.; MASAMUNE, T. Laurinterol, debromolaurinterol and isolaurinterol, constituents of *Laurencia intermedia* Yamada. **Tetrahedron**, v. 26, p.3271-3277, 1970.

ISHIZAKI, T.; KAMO, E.; BOCHME, K. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, p. 787-791, 1979.

ITOH, T.; KOKETSU, M.; YOKOTA, N.; TOUHO, S.; ANDO, M.; TSUKAMASA, Y. Reduced scytonemin isolated from *Nostoc commune* suppresses LPS/IFN γ -induced NO production in murine macrophage RAW264 cells by inducing hemoxygenase-1 expression via the Nrf2/ARE pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 330-338, 2014.

JAMERS, A.; BLUST, R.; DE COEN, W. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? **Aquatic Toxicology**, v. 92, ed. 3, p. 114-121, 2009.

JANTAN, I.; ALI, N. A. M.; AHMAD, A. S.; AHMAD, A. R. Constituents of the essential oil of *Leptospermum javanicum* blume from peninsular Malaysia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10 (4), p. 255-258, 1995.

JUNG, S.; LEE, J.; SONG, H.; SEONG, N.; LEE, S.; BAEK, N. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. **Applied Biological Chemistry**, v. 47 (1), p. 135-140, 2004.

KALOGEROPOULOU, A. **Pre-processing and analysis of high-dimensional plant metabolomics data**. Tese (Doutorado) - University of East Anglia, Norwich, Inglaterra.

KARADENIZ, F.; KANG, K. H.; PARK, J. W.; PARK, S. J.; KIM, S. K. Anti-HIV-1 activity of phlorotannin derivative 8,4''-dieckol from Korean brown alga *Ecklonia cava*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, p. 1151-1158, 2014.

KATZ, N.; ROCHA, R.; CHAVES, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, p. 781-785, 1979.

KAWANO, T. Agentes que atuam sobre a morfogênese da região cefálica de alguns moluscos. **Ciência e Cultura**, p. 116-166, 1983.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (*Pulmonata, Planorbidae*). **Proceedings C.**, v. 90, n. 3, p. 281-302, 1987.

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, n. 1-2, p. 25-32, 1992.

KOLESNIKOVA, S. A.; KALINOVSKY, A. I.; FEDOROV, S. N.; SHUBINA, L. K.; STONIK, V. A. Diterpenes from the far-eastern brown alga *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2115-2119, 2006.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 967-970, 1997.

KUSEL, J. R.; GORDON, J. F. Biophysical studies of the schistosome surface and their relevance to its properties under immune and drug attack. **Parasite Immunology**, v. 11, p. 431-445, 1989.

LEE, S.; ATHUKORALA, Y.; LEE, J.; JEON, Y. Simple separation of anticoagulant sulfated galactan from marine red algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 6, p. 1053-1059, 2008.

LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J. A.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 254-259, 2009.

LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (*Leguminosae*). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 163-170, 2002.

MACHADO, F. L. S.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S.; GESTINARI, L. M. S.; SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 441-452, 2010.

MACHADO, F. L. S.; PACIENZA-LIMA, W.; ROSSI-BERGMANN, B.; GESTINARI, L. M. S.; FUJII, M. T.; PAULA, J. C.; COSTA, S. S.; LOPES, N. P.; KAISER, C. R.; SOARES, A. G. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Medica**, v. 77, p. 733-735, 2011.

MANZO, E.; CIAVATTA, M. L.; BAKKAS, S.; VILLANI, G.; VARCAMONTI, M.; ZANFARDINO, A.; GAVAGNIN, M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 211-215, 2009.

MARTIN, C. Y.; KOFRON, J. L.; TRAPHAGEN, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? **Journal of Medical Chemistry**, v. 45, ed. 19, p. 4350-4358, 2002.

MARTÍN J. D.; DARIAS, J. Algal sesquiterpenoids. In: SCHEUER, P. J. **Marine Natural Products - Chemical and Biological Perspectives**. New York: Academic Press, v. 1, p. 125-173, 1978.

MARTINS, M. C. B.; SILVA, M. C.; SILVA, L. R. S.; LIMA, V. L. M.; PEREIRA, E. C.; FALCÃO, E. P. S.; MELO, A. M. M. A.; SILVA, N. H. Usnic acid potassium salt: an

alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-6, 2014.

MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. Sativa seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 205-211, 2005.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MUKAI, A.; TAKAHASHI, K.; ASHITANI, T. Natural autoxidation of longifolene and anti-termite activities of the products. **Journal of Wood Science**, v. 63, n. 4, p. 360-368, 2017.

NAGAYAMA, K.; IWAMURA, Y.; SHIBATA, T.; HIRAYAMA, I.; NAKAMURA, T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 889-893, 2002.

NAIR, R.; KALARIYA, T.; CHANDA, S. Antibacterial activity of some selected indian medicinal flora. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, p. 41-47, 2005.

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

NIKOLOVA, N.; JAWORSKA, J. Approaches to measure chemical similarity - a review. **Molecular Informatics**, v. 22, ed. 9, p. 1006-1026, 2004.

NUNES, J. M. C.; PAULA, E. J. O gênero *Dictyota Lamouroux* (*Dictyotaceae - Phaeophyta*) no litoral do estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Malacitana**, v. 26, p. 5-18, 2001.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GERALDINO, B. R.; COELHO, D. R.; DE-CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere**, v. 81, n. 2, p. 218-227, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. 1977. Tese de Livre Docência. Livre docência em Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, A. S.; SUDATTI, D. B.; FUJII, M. T.; RODRIGUEZ, S. V.; PEREIRA, R. C. Inter-and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 52, n. 2, p. 130-136, 2013.

PAHO - Pan American Health Organization. Schistosomiasis. **Big threats: protect yourself and your environment from vector-borne diseases**. World Health Day, 2014. Disponível em <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/Schistosomiasis.pdf>> Acesso em: 12/04/2018.

PAULINI, E. Current status of knowledge of molluscicides. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 17, n. 4, p. 355-62, 1965.

PAVELA, R. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. **Pest Technology**, v. 1 (1), p. 47-52, 2007.

PELEGRIN, Y. F.; ROBLEDO, D.; BACAB, M. J. C.; MORALES, B. O. O. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia**, v. 79, n. 5, p. 374-377, 2008.

PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. **Química Nova**, v. 22, p. 369-374, 1999.

PEREIRA, H. S.; LEÃO-FERREIRA, L. R.; MOUSSATCHÉ, N.; TEIXEIRA, V. L.; CAVALCANTI, D. N.; COSTA, L. J.; DIAZ, R.; FRUGULLHETTI, I. C. P. P. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazillian marine algae *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, v. 64, n. 1, p. 69-76, 2004.

PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 665-672, 2003.

PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). Significado ecológico. **Química Nova**, v. 22, p. 369-374, 1999.

PORDEUS, L. C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. M.; BARBOSA, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

RAPADO, L. N. **Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de *Piper* em modelos biológicos para o controle da esquistossomose mansônica**. 2012. Tese - Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RAPADO, L. N.; FREITAS, G. C.; POLPO, A.; ROJAS-CARDOZO, M.; RINCÓN, J. V.; SCOTTI, M. T.; KATO, M. J.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F. A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5205-5218, 2014.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, F. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, v. 85, n. 1, p. 66-72, 2011.

REY, L. **Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. Guanabara Koogan, São Paulo, p. 883, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. Guanabara Koogan, São Paulo, p.731, 1991.

ROCHA, T. J. M.; NASCIMENTO-FILHO, B. P.; NOÉ, B. D. R.; JÚNIOR, C. P. V.; COSTA, G. N.; ARAGÃO, M. B.; DOS SANTOS, A. F. Estudo do efeito moluscicida de

espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* (SAY 1818) (Gastropoda, Planorbidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 2, p. 230-239, 2013.

SAAD, A. E. A.; RAGAB, F. M. A.; FATAH, H. M. A.; ABDEL-WARETH, M. T. A.; IBRAHIM, N. K. Effect of *Cystoseira barbata* and *Dictyota dichotoma*-algae on reproduction and protein pattern of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Molluscan Research**, v. 39, p. 82-88, 2018.

SANTOS, A. O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2733-2743, 2010.

SANTOS, C. C. S.; ARAÚJO, S. S.; SANTOS, A. L. L. M.; ALMEIDA, E. C. V.; DIAS, A. S.; DAMASCENA, N. P.; SANTOS, D. M.; SANTOS, M. I. S.; JÚNIOR, K. A. L. R.; PEREIRA, C. K. B.; LIMA, A. C. B.; SHAN, A. Y. K. V.; SANT'ANA, A. E. G.; ESTEVAM, C. S.; ARAUJO, B. S. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 298-303, 2014.

SHELTEMA, R. A.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. C.; WATSON, D. G.; JANSEN, R. C.; BREITLING, R. Simple data-reduction method for high-resolution LC-MS data in metabolomics. **Bioanalysis**, v. 1, ed. 9, p. 1551-1557, 2009.

SKELLY, P. J.; ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, p. 185-284, 2006.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H. Heparinoid-Active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current Science**, vol. 79, n. 12, p. 1672-1683, 2000.

SILVA, K. E. R.; SILVA, R. M. F.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; ROLIM-NETO, P. J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, 2012.

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

SIMS, J. J.; LIN, G. H.; WING, R. M. Marine natural products. X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Letters**, v. 15, p. 3487-3490, 1974.

SOARES, A. R.; ROBAINA, M. C. S.; MENDES, G. S.; SILVA, T. S. L.; GESTINARI, L. M. S.; PAMPLONA, O. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; KAISER, C. R.; ROMANOS, M. T. V. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 714-723, 2012 .

SONG, B.; KIM, I.; LEE, S.; CHOI, E.; HAM, O.; LEE, S.; LEE, C. Y.; PARK, J.; LEE, J.; SEO, H.; CHANG, W.; YOON, C.; HWANG, K. 1H-pyrrole-2,5-dione-based small molecule-induced generation of mesenchymal stem cell-derived functional endothelial cells that facilitate rapid endothelialization after vascular injury. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, n. 1, p. 174, 2015.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 2^a ed - Belo Horizonte: Fiocruz/CPqRR, 79 p, 1997.

STEIN, E. M.; MACHADO, L. P.; ROFFATO, H. K.; MIYASATO, P. A.; NAKANO, E.; COLEPICOLA, P.; ANDREGUETTI, D. X. Antischistosomal activity from Brazilian marine algae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 6, p. 663-667, 2015.

STIRK, W. A.; REINECKE, D. L.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2007.

SUJATHA, R.; SIVA, D.; NAWAS, P. M. A. Screening of phytochemical profile and antibacterial activity of various solvent extracts of marine algae *Sargassum swartzii*. *World Scientific News*, v. 115, p. 27-40, 2018.

TALLARICO, L. F.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). *Mutation Research*, v. 561, p. 139-145, 2004.

TAYLOR, W. R. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas**. The University of Michigan Press, Ann Arbor, p. 870, 1960.

TZAKOU, O.; VAGIAS, C.; GANI, A.; YANNITSAROS, A. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 19, p. 425-428, 2004.

UKWANDU, N. C. D.; ODAIBO, A. B.; OKORIE, T. G.; NMORSI, O. P. G. Molluscicidal effect of *Piper guineense*. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, v. 8, n. 4, p. 447-451, 2011.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 1487-1495, 2003.

VAIRAPPAN, C. S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomolecular engineering*, v. 8, n.1-4, p. 255-259, 2003.

VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. In-vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology*, v. 137, p. 1661-1670, 2010.

VERAS, L. M.; GUIMARAES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051-2058, 2012.

VINAUD, M. C.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; JUNIOR, R. S. L.; BEZERRA, J. C. B. Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* ssp. sobre miracídeos e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 137-143, 2005.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; JÚNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, 2012.

WANKE, T. **Isolamento de metabólitos halogenados de *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea* de Santa Catarina, Brasil**. Tese - Doutorado. 2014. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Molluscicides - Technical Report Series**. World Health Organization, Suíça, v. 214, p. 1-59, 1961.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Molluscicide screening and evaluation**. World Health Organization, Suíça, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the scientific working group on plant molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 12, n. 1, p. 11, 1983.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis - Technical Report Series**. World Health Organization, Suíça, v. 728, p. 1-113, 1985.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert Committee**. Geneva: WHO, 1993.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee**. World Health Organization, Suíça, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis - Situation and trends**. Observatory (GHO) data, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en/> Acesso em: 03/04/2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers**. World Health Organization, Suíça, 2017.

WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M.; DE NYS, R.; STICHER, O. Seven new metabolites from the marine red algae *Laurencia majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 394-401, 1993.

WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M.; STICHER, O. New sesquiterpenes and C15 acetogenins from the marine red algae *Laurencia implicata*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1025-1033, 1991.

YOON, W.; HAM, Y. M.; KIM, K.; PARK, S.; LEE, N. H.; HYUN, C.; LEE, W. J. Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1

Ensaio de atividade biológica dos extratos em hexano (LD-EH), em diclorometano (LD-DCM), em metanol (LD-EM) e em água (LD-H2O) de *L. dendroidea* em embriões de *B. glabrata* em estágio blástula e véliger.

Extrato	Número de Embriões		% Embriões Malformados		% Embriões Mortos	
	Blastula	Véliger	Blástula	Véliger	Blástula	Véliger
LD-EH	75	86	0	0	100	100
LD-DCM	94	66	0	0	100	100
LD-EM	73	59	0	0	100	100
LD-H2O	52	65	0	0	0	0
CT H2O	57	51	0	0	0	0
CT DMSO	66	84	0	0	0	0

CT: Controle

ANEXO 2 Ensaio de atividade biológica das frações do extrato em diclorometano de *L. dendroidea* em cercárias de *S. mansoni*.

Extrato	Fração	Nº de Cercárias	Mortalidade (%)/Tempo (min)				
			5	15	30	60	120
LD-DCM	1 - 8	104	0	1,9	2,9	31,7	35,6
LD-DCM	9 - 11	99	0	0	5,1	21,2	30,3
LD-DCM	12 - 14	102	3,9	90,2	95,1	100	100
LD-DCM	15 - 19	103	8,7	75,7	90,3	100	100
LD-DCM	20 - 22	103	27,2	88,3	96,1	100	100
LD-DCM	23 - 25	104	100	100	100	100	100
LD-DCM	26 - 27	97	100	100	100	100	100
LD-DCM	28 - 30	101	35,6	100	100	100	100
LD-DCM	31 - 32	102	100	100	100	100	100
LD-DCM	33	102	100	100	100	100	100
LD-DCM	34 - 36	100	100	100	100	100	100
LD-DCM	37	96	100	100	100	100	100
LD-DCM	38 - 53	97	100	100	100	100	100
LD-DCM	54 - 66	107	100	100	100	100	100
LD-DCM	67 - 75	105	100	100	100	100	100
LD-DCM	76 - 88	99	9,1	68,7	68,7	69,7	83,8
LD-DCM	89 - 126	101	55,4	59,4	63,4	65,3	71,3
LD-DCM	127 - 133	100	52,0	60,0	64,0	67,0	75,0
LD-DCM	134 - 140	101	21,8	35,6	40,6	45,5	48,5
LD-DCM	141 - 178	107	0	0	20,56	20,56	20,56
LD-DCM	179 - 215	104	10,58	10,58	30,77	40,38	60,58
LD-DCM	216 - 217	101	9,90	9,90	14,85	14,85	14,85
LD-DCM	218 - 222	101	22,77	24,75	29,70	29,70	29,70
LD-DCM	223 - 229	99	0	0	5,05	8,08	8,08
LD-DCM	230 - 236	102	10,78	12,75	26,47	26,47	31,37
LD-DCM	237 - 252	110	0	0	13,64	66,36	66,36
LD-DCM	253 - 263	103	0	0	0	83,54	85,44
LD-DCM	265	105	100	100	100	100	100
LD-DCM	266	112	10,71	23,21	23,21	23,21	25,89
LD-DCM	267	102	100	100	100	100	100
LD-DCM	268	104	100	100	100	100	100
LD-DCM	269 - 275	102	100	100	100	100	100
LD-DCM	276 - 282	96	100	100	100	100	100
LD-DCM	283 - 287	102	100	100	100	100	100
LD-DCM	288 - 290	106	0	0	0	0	0
LD-DCM	291 - 294	101	0	0	0	0	0
LD-DCM	295 - 296	101	0	0	0	0	0
LD-DCM	297	104	0	0	0	0	0
LD-DCM	298 - 299	107	0	0	0	38,32	38,32
CT	H2O	109	0	0	1,83	4,59	7,34
CT	DMSO	102	0	0	2,94	4,90	8,82

CT: Controle

ANEXO 3

Ensaio de atividade biológica de frações do extrato em diclorometano de *L. dendroidea* em embriões de *B. glabrata* em estágio blástula e véliger.

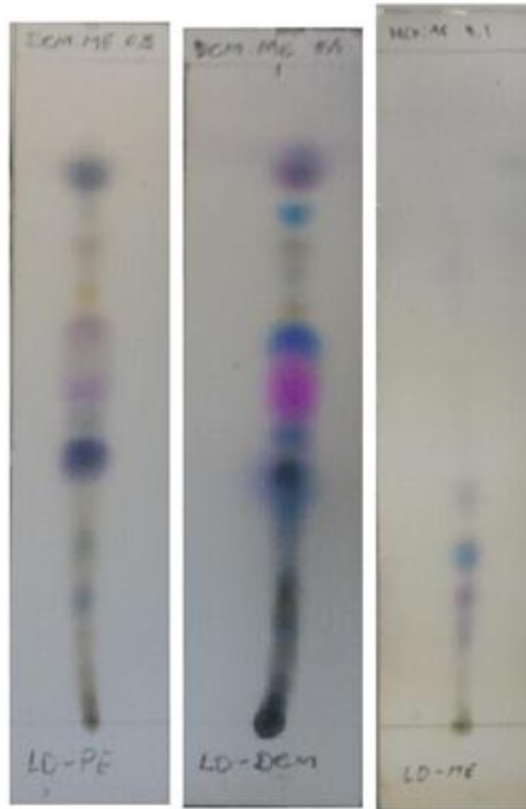
Extrato	Nº de Embriões		% Embriões Malformados		% Embriões Mortos	
	Blástula	Véliger	Blástula	Véliger	Blástula	Véliger
CT H2O	53	53	0	0	0	0
CT						
DMSO	51	51	0	0	0	0
LD-DCM						
1-8	52	56	0	0	0	0
LD-DCM						
9-11	56	52	0	0	0	0
LD-DCM						
12-14	50	54	0	0	0	0
LD-DCM						
15-19	56	56	0	0	0	0
LD-DCM						
20-22	52	57	0	0	21,15	0
LD-DCM						
23-25	53	51	0	0	100	43,14
LD-DCM						
26-27	56	51	0	0	100	0
LD-DCM						
28-30	56	52	0	0	100	0
LD-DCM						
31-32	55	54	0	0	100	66,67
LD-DCM						
33	51	55	0	0	100	100
LD-DCM						
34-36	54	57	0	0	100	100
LD-DCM						
37	59	63	0	0	100	100
LD-DCM						
38-53	60	60	0	0	100	100
LD-DCM						
54-66	52	57	0	0	100	82,46
LD-DCM						
67-75	52	56	0	0	40,38	0
LD-DCM						
76-88	56	53	0	0	100	0
LD-DCM						
89-126	51	57	0	0	100	0
LD-DCM						
127-133	51	53	0	0	25,49	0
LD-DCM						
134-140	53	50	0	0	100	0
LD-DCM						
141-178	50	56	0	0	0	0
LD-DCM						
179-215	60	58	0	0	100	0
LD-DCM						
216-217	51	52	0	0	0	0
LD-DCM						
218-222	60	57	0	0	46,67	0
LD-DCM						
223-229	58	59	0	0	0	0
LD-DCM						
230-236	50	54	2	0	0	0
LD-DCM						
237-252	54	59	0	0	0	0
LD-DCM						
253-263	55	54	0	0	0	0
LD-DCM						
265	50	55	0	0	100	100

LD-DCM							
266	52	58	0	0	0	0	
LD-DCM							
267	53	63	0	0	100	0	
LD-DCM							
268	52	54	0	0	100	100	
LD-DCM							
269-275	56	57	0	0	100	100	
LD-DCM							
276-282	60	50	0	0	100	0	
LD-DCM							
283-287	58	51	0	0	100	0	
LD-DCM							
288-290	61	53	0	0	0	0	
LD-DCM							
291-294	54	54	0	0	0	0	
LD-DCM							
295-296	51	65	0	0	0	0	
LD-DCM							
297	62	52	0	0	0	0	
LD-DCM							
298-299	54	51	0	0	100	0	
LD-DCM							
300	-	-	-	-	-	-	
LD-DCM							
301	-	-	-	-	-	-	
LD-DCM							
302	-	-	-	-	-	-	
LD-DCM							
303	-	-	-	-	-	-	
LD-DCM							
304-340	-	-	-	-	-	-	

CT: Controle

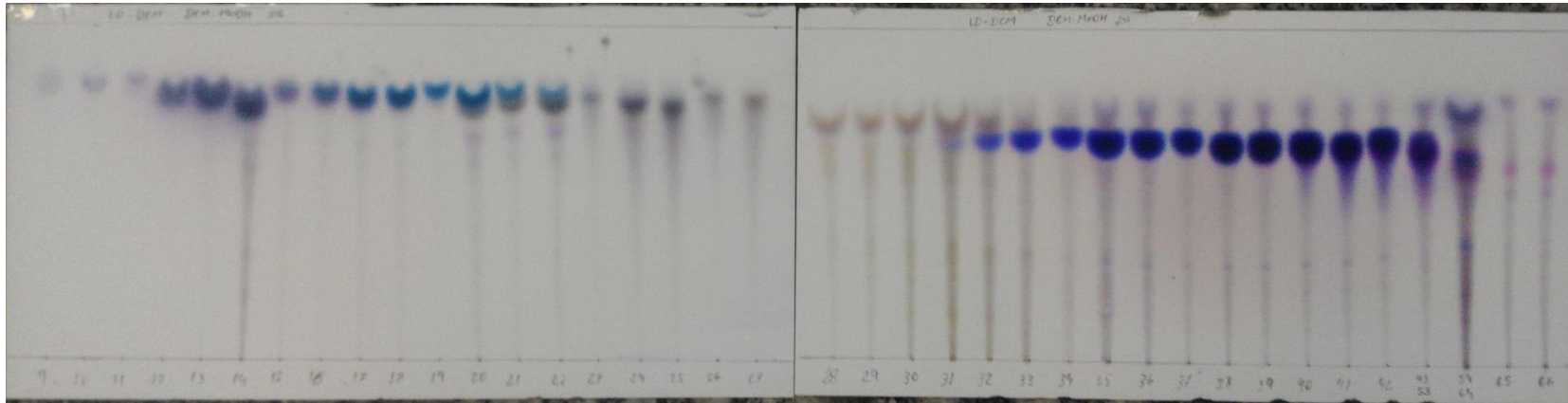
ANEXO 4

Cromatografia em camada delgada em placa de sílica dos extratos em éter de petróleo (LD-EP), diclorometano (LD-DCM) e metanol (LD-ME) de *L. dendroidea*. Fase móvel: diclorometano/metanol 2% para LD-EP e LD-DCM, e hexano/acetona 10% para LD-ME; revelador: reagente de Komarovsky.



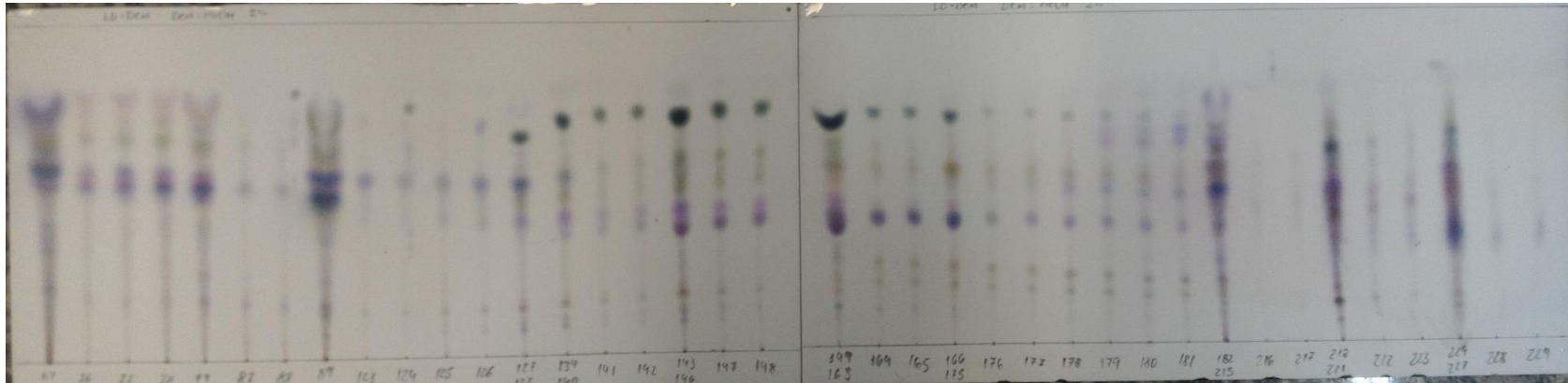
ANEXO 5

Cromatografia em camada delgada em placa analítica de sílica das frações 9 a 66 do extrato em diclorometano de *L. dendroidea*. Fase móvel: diclorometano/metanol 2%, revelador: reagente de Komarovsky.



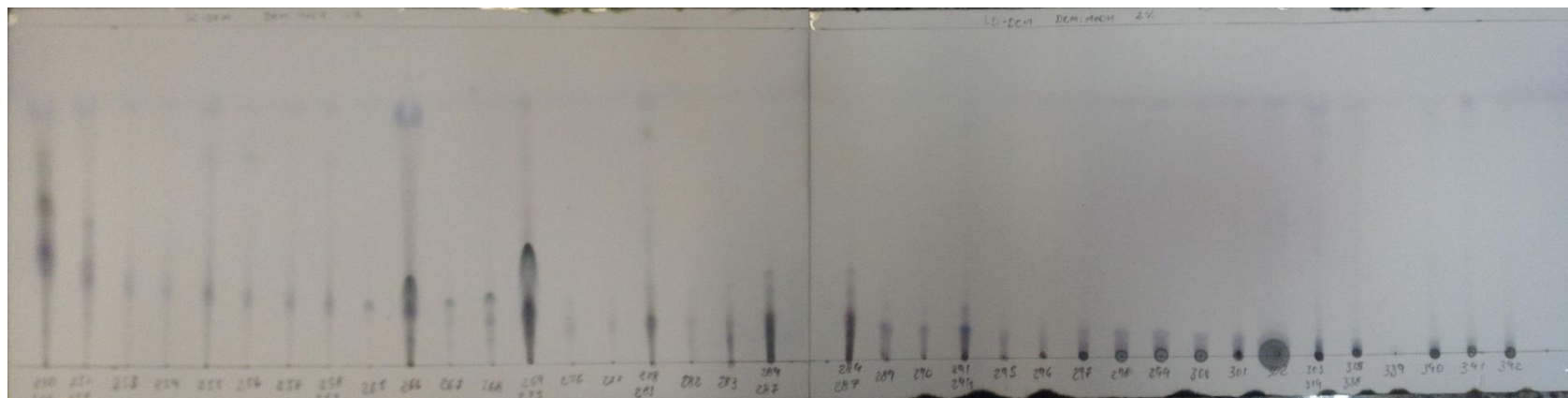
ANEXO 6

Cromatografia em camada delgada em placa analítica de sílica das frações 67 a 229 do extrato em diclorometano de *L. dendroidea*. Fase móvel: diclorometano/metanol 2%, revelador: reagente de Komarovsky.



ANEXO 7

Cromatografia em camada delgada em placa analítica de sílica das frações 270 a 342 do extrato em diclorometano de *L. dendroidea*. Fase móvel: diclorometano/metanol 2%, revelador: reagente de Komarovsky.



ANEXO 8

Identificação, concentração relativa e índice de similaridade de compostos de *Laurencia dendroideia* presentes em extrato de diclorometano (DCM) analisado por CG-EM. Onde: TR, tempo de retenção; IK_{ob}, índice de Kovats obtido; IK_{lit}, índice de Kovats na literatura.

N°	TR (min)	IK ob	IK lit	Composto	%	
					Extrato	Similaridade
1	10,233	1070,708	1068 ¹	Egitol	0,06	92
2	12,458	1127,779	1131.2 ²	1-(4-Methyl-3-cyclohexen-1-yl)ethanone	0,02	85
3	12,458	1127,779	1131.2 ²	4-Acetyl-1-methylcyclohexene	0,02	83
4	16,625	1226,847	1234.8 ²	Methylethylmaleimide	0,01	86
5	22,458	1362,867	1367 ³	Isolongifolene	1,73	85
6	23,242	1381,293	1398 ^{4*}	.alpha.-Gurjunene	0,2	90
7	24,100	1401,51	1410 ^{5*}	Aromadendrene	0,14	85
8	25,258	1429,713	1429.6 ⁶	1-Caryophyllene	0,04	87
9	30,025	1547,972	1557 ^{8*}	LONGIFOLEN-V2	0,99	87
10	36,200	1711,158	1711 ^{9*}	Pentadecanal	0,97	93
11	37,808	1756,352	1756 ^{10*}	Myristic acid	0,51	93
12	37,808	1756,352	1756 ^{10*}	Tridecanoic acid	0,51	92
13	44,658	1958,552	1958 ^{11*}	Palmitic acid	2,23	92
14	50,025	2130,34	2123 ^{12*}	Oleic Acid	0,87	87
15	53,308	2242,556	2250 ¹⁴	Tributyl acetylcitrate	1,1	93
16	54,792	2294,663	2282.3 ^{15*}	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester	1,76	91
17	67,742	2800,845	2814 ^{16*}	trans-Squalene	0,19	93
18	67,742	2800,845	2814 ^{16*}	Squalene	0,19	92
19	77,250	3071,752	3071 ^{17*}	Cholesterol	2,23	87

¹ Castello and Gerbino, 1988; ² Andriamaharavo, 2014; ³ Tzakou et al., 2004; ⁴ Jantan, Ali, et al., 1995; ⁵ Dob, Dahmane, et al., 2006; ⁶ Ament K., Kant M.R., et al., 2004; ⁷ Bos, Woerdenbag, et al., 1997; ⁸ Skaltsa, Demetzos, et al., 2003; ⁹ Pavlovic, Petrovic, et al., 2007; ¹⁰ Bendiabdellah, El Amine Dib, et al., 2012; ¹¹ Stojanovic, Radulovic, et al., 2011; ¹² Ansorena, Astiasarán, et al., 2000; ¹³ VOC BinBase, 2012; ¹⁴ Mondello, 2012; ¹⁵ Tret'yakov, 2007; ¹⁶ Kurashov, Mitrukova, et al., 2014; ¹⁷ Quilliam and Westmore, 1978. * Coluna na literatura é diferente da usada nesse estudo.

ANEXO 9Ensaio de atividade biológica para determinação da CL₅₀ do elatol em embriões em estágio blástula de *B. glabrata*.

Concentração (µg/mL)	Mortalidade								
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)
Controle H2O	115	0	0	75	0	0	107	0	0
Controle DMSO	89	0	0	52	0	0	75	0	0
100	106	106	100	48	48	100	75	75	100
50	113	113	100	58	58	100	68	68	100
25	89	89	100	68	68	100	81	81	100
12,5	92	92	100	60	60	100	54	54	100
6,25	80	80	100	67	67	100	60	60	100
5,5	66	66	100	69	69	100	69	69	100
4,7	64	64	100	45	45	100	60	60	100
3,93	51	51	100	59	59	100	53	53	100
3,13	56	56	100	62	62	100	55	55	100
2,74	54	54	100	58	58	100	72	72	100
2,35	56	56	100	57	57	100	62	62	100
1,9	51	51	100	47	47	100	55	55	100
1,56	53	53	100	55	55	100	62	62	100
0,8	57	44	77,19	54	39	72,22	41	31	75,61
0,7	52	35	67,31	63	39	61,90	54	36	66,67
0,6	45	24	53,33	57	29	50,88	52	26	50,00
0,5	41	19	46,34	57	25	43,86	59	27	45,76
0,4	52	21	40,38	54	23	42,59	53	21	39,62
0,3	49	11	22,45	56	13	23,21	68	17	25,00
0,2	64	0	0	55	0	0	51	0	0

ANEXO 10

Ensaio de atividade biológica para determinação da CL₅₀ do elatol em embriões em estágio véliger de *B. glabrata*.

Concentração (ug/mL)	Mortalidade (%)								
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)	Nº Embriões	Nº Embriões Mortos	Nº Embriões Mortos (%)
Controle H2O	74	0	0	49	0	0	90	0	0
Controle DMSO	92	0	0	57	0	0	66	0	0
100	88	88	100	42	42	100	85	85	100
50	85	85	100	42	42	100	66	66	100
25	62	62	100	49	49	100	59	59	100
18,75	63	63	100	71	71	100	70	70	100
12,5	75	75	100	46	46	100	67	67	100
9,38	56	56	100	70	70	100	71	71	100
6,25	54	54	100	54	54	100	47	47	100
5,9	55	48	87,27	60	51	85,00	63	56	88,89
5,5	56	41	73,21	69	52	75,36	52	36	69,23
5,1	65	45	69,23	59	40	67,80	55	37	67,27
4,9	59	35	59,32	62	39	62,90	75	48	64,00
4,7	57	33	57,89	53	31	58,49	65	37	56,92
4,2	70	36	51,43	56	30	53,57	73	38	52,05
3,93	73	22	30,14	57	17	29,82	55	17	30,91
3,13	77	10	12,99	54	6	11,11	59	8	13,56
2,74	95	11	11,58	56	6	10,71	53	6	11,32
2,35	51	0	0	56	3	5,36	51	1	1,96

ANEXO 11

Ensaio de atividade biológica dos compostos elatol, obtusol e iso-obtusol em cercárias de *S. mansoni*.

Composto (25 mg.L ⁻¹)	Nº de Cercárias	Réplica 1					Nº de Cercárias	Réplica 2					Nº de Cercárias	Réplica 3				
		Mortalidade (%)/Tempo (min)						Mortalidade (%)/Tempo (min)						Mortalidade (%)/Tempo (min)				
		5	15	30	60	120		5	15	30	60	120		5	15	30	60	120
CT Água	110	0,0	0,0	1,8	5,5	5,5	183	0,0	3,3	6,0	3,8	3,8	179	0,0	1,7	7,3	3,4	4,5
CT DMSO	107	3,7	3,7	4,7	7,5	7,5	181	0,0	4,4	4,4	4,4	4,4	194	0,0	3,1	5,7	7,2	4,6
Elatol	131	100	100	100	100	100	196	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100
Obtusol	111	100	100	100	100	100	73	100	100	100	100	100	105	100	100	100	100	100
Iso-Obtusol	153	100	100	100	100	100	135	100	100	100	100	100	100,0	100	100	100	100	100