



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

THAYNARA MARIA ARANTES

**GENOTOXICIDADE E EMBRIOTOXICIDADE DOS ELEMENTOS
URÂNIO E CÁDMIO FRENTE A MOLUSCOS *BIOMPHALARIA
GLABRATA***

Recife
2025

THAYNARA MARIA ARANTES

**GENOTOXICIDADE E EMBRIOTOXICIDADE DOS ELEMENTOS
URÂNIO E CÁDMIO FRENTE A MOLUSCOS *BIOMPHALARIA
GLABRATA***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Coorientador: Dr. Dewson Rocha Pereira

Recife
2025

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

Arantes, Thaynarara Maria .

Genotoxicidade e embriotoxicidade dos elementos urânio e cádmio frente a moluscos *Biomphalaria glabrata* / Thaynarara Maria Arantes. - Recife, 2025. 42 : il., tab.

Orientador(a): Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Coorientador(a): Dewson Rocha Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, anexos.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. Ensaio cometa. 3. Meio ambiente. 4. Elementos químicos. I. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque . (Orientação). II. Pereira, Dewson Rocha . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

THAYNARA MARIA ARANTES

**GENOTOXICIDADE E EMBRIOTOXICIDADE DOS ELEMENTOS
URÂNIO E CÁDMIO FRENTE A MOLUSCOS *BIOMPHALARIA
GLABRATA***

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dra. Osana Diniz Ferreira
CRCN-NE/ Departamento de Dosimetria Biológica

Me. Thierry Wesley de Albuquerque Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Bioquímica

Dedico este trabalho à minha família e amigos, por todo apoio durante minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder sabedoria, força e perseverança para concluir esta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus orientadores, Prof^a Ana Maria e Dewson, pelo incentivo e conhecimentos passados durante minha trajetória.

Agradeço aos membros do Laboratório de Radiobiologia pela contribuição no meu processo de aprendizagem.

Agradeço à CNEN, CRCN-NE e CNPq pelo financiamento da bolsa de iniciação científica, que contribuiu com meu desenvolvimento acadêmico e científico.

Agradeço à minha mãe, Cristiane e ao meu irmão, Emerson, por serem minha base. Agradeço por todo apoio, paciência e suporte, que foram essenciais.

Agradeço às minhas amigas, Andreza e Karine, pelo companheirismo em nossa relação levemente tóxica, por me darem apoio, pelos surtos compartilhados durante a graduação, por todas as fofocas, unhas pintadas, danças fora do ritmo e cantorias belíssimas, as quais certamente afetaram a audição de alguém (sem vocês teria sido um saco).

Agradeço à todos os membros do grupo “Panelinha” (Andreza, Karine, Delson, Little Cherry, Osanhia, João Ritinto Magal e João Emanuel) pelo apoio incondicional, pelos rolês, bebidas, cafés, fofocas e por tolerarem minhas piadas extremamente engraçadas e desprovidas de ofensas a terceiros. Vocês foram essenciais e moram no meu coração, mas, por favor, paguem o aluguel.

Agradeço às minhas amigas Nataly, Rafaela e Hallhene, que me apoiaram e incentivaram em cada etapa desta jornada acadêmica e por sempre me entregarem fofocas quentinhas diretamente do ôu.

Agradeço ao meu cocoricó, Thierry Wesley, vulgo Little Cherry, por sempre me apoiar e me acompanhar durante a graduação. Também agradeço por nossas fofocas noturnas, pipocas, por aturar meus leves surtos, por me perdoar nas vezes que assisti HIMYM sem você e por ser meu companheiro de shows.

Agradeço a tio Dema, tia Valéria, tio Xande, tia Sheyla e dona Fia por todo o apoio, cafés e por serem minha família na cidade grande. Vocês foram essenciais durante minha trajetória.

***“Feliz pelo que ainda não veio
E saudades do que nem foi
Esperando o melhor dos agoras (...)”
Nação Zumbi***

ARANTES, Thaynara Maria. **Genotoxicidade e embriotoxicidade dos elementos urânio e cádmio frente a moluscos *Biomphalaria glabrata***. 2025. 42. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

O aumento de elementos químicos metálicos no meio ambiente está relacionado ao descarte da indústria mineradora, agricultura, lixo doméstico e diversas atividades humanas, sendo os ambientes aquáticos e os oceanos o destino destes poluentes. Os metais fazem parte de uma classe de elementos químicos potencialmente tóxicos, entre os quais se destacam o cádmio e o urânio. Embora sejam encontrados naturalmente no meio ambiente, em concentrações elevadas, tornam a água e os alimentos impróprios para o consumo. A contaminação pelo urânio pode ser considerada um problema de saúde pública, devido a sua capacidade de bioacumular no meio ambiente, além de estar relacionada com o aumento na incidência de câncer ósseo, fígado e pulmão. O cádmio, por sua vez, é um metal pesado não essencial que representa uma ameaça potencial aos seres vivos e aos ecossistemas aquáticos, pois sua ingestão, mesmo que em baixos níveis, é capaz de afetar órgãos vitais, como pulmão, rins e tecidos ósseos. Dessa forma, avaliar a qualidade desses ambientes, por meio de bioindicadores, é de suma importância para a saúde pública. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar os moluscos *Biomphalaria glabrata* como bioindicadores da citotoxicidade, genotoxicidade e embriotoxicidade do urânio e cádmio, expostos por 48 horas, as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L, em ambientes aquáticos. Para isso, foram realizados testes de citotoxicidade em hemócitos de *B. glabrata* utilizando o corante azul de tripan para determinação da citotoxicidade. Em seguida, foi utilizado o ensaio cometa alcalino para avaliação dos danos ao material genético dos moluscos expostos às diferentes concentrações dos elementos químicos estudados. Para os testes de embriotoxicidade foram separados embriões no estágio de blástula (n=100) para proceder a exposição aos elementos urânio e cádmio. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os resultados indicaram que apenas a concentração de 1 mg/L de urânio induziu a citotoxicidade nos caramujos adultos. A exposição ao cádmio não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração estudada. A análise do ensaio cometa, demonstrou que ambos os elementos causaram danos ao DNA dos hemócitos dos moluscos expostos às diferentes concentrações testadas. No estudo da embriotoxicidade pode-se observar que a concentração de 1 mg/L de urânio resultou na inviabilidade total dos embriões. Dessa forma, pode-se observar que o molusco *B. glabrata* poderá ser utilizado como modelo experimental para auxiliar na prevenção e no controle da presença de metais em ambientes aquáticos, o que impactará diretamente na saúde pública.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*. Ensaio cometa. Meio ambiente. Elementos químicos.

ARANTES, Thaynara Maria. Genotoxicity and embryotoxicity of the elements uranium and cadmium against *Biomphalaria glabrata* molluscs. 2025.42. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

The increase in metallic chemical elements in the environment is related to disposal by the mining industry, agriculture, domestic waste and various human activities, with aquatic environments and oceans being the destination of these pollutants. Metals are part of a class of potentially toxic chemical elements, among which cadmium and uranium stand out. Although they are found naturally in the environment, in high concentrations they make water and food unfit for consumption. Uranium contamination can be considered a public health problem due to its ability to bioaccumulate in the environment, as well as being linked to an increase in the incidence of bone, liver and lung cancer. Cadmium, in turn, is a non-essential heavy metal that represents a potential threat to living beings and aquatic ecosystems, since its ingestion, even at low levels, is capable of affecting vital organs such as the lungs, kidneys and bone tissue. Therefore, assessing the quality of these environments using bioindicators is of the utmost importance for public health. Therefore, the aim of this study was to use *Biomphalaria glabrata* molluscs as bioindicators of the cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of uranium and cadmium, exposed for 48 hours to concentrations of 0.01, 0.1 and 1 mg/L in aquatic environments. To this end, cytotoxicity tests were carried out on *B. glabrata* hemocytes using trypan blue dye to determine cytotoxicity. The alkaline comet assay was then used to assess damage to the genetic material of molluscs exposed to different concentrations of the chemical elements studied. For the embryotoxicity tests, embryos at the blastula stage (n=100) were separated for exposure to the elements uranium and cadmium. The experiments were carried out in triplicates. The results indicated that only a concentration of 1 mg/L of uranium induced cytotoxicity in adult snails. Exposure to cadmium showed no cytotoxicity at any of the concentrations studied. Analysis of the comet assay showed that both elements caused damage to the DNA of the hemocytes of the molluscs exposed to the different concentrations tested. In the embryotoxicity study, it can be seen that the concentration of 1 mg/L of uranium resulted in the total inviability of the embryos. In this way, it can be seen that the *B. glabrata* mollusc can be used as an experimental model to help prevent and control the presence of metals in aquatic environments, which will have a direct impact on public health.

Key words: *Biomphalaria glabrata*. Comet essay. Environment. Chemical elements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Molusco adulto da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	16
Figura 2	– Distribuição geográfica do caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil	17
Figura 3	– Órgãos internos do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto	18
Figura 4	– Hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> sendo (A) Granulócito e (B) Hialinócito. Aumento 100x	19
Figura 5	– Graus de danos ao DNA de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	22
Figura 6	– Fases do desenvolvimento de <i>Biomphalaria glabrata</i>	24
Figura 7	– Tanques de criação do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> do moluscário do Laboratório de Radiobiologia	26
Figura 8	– Equipamento de eletroforese horizontal com lâminas com agarose e amostras de hemolinfa	28
Figura 9	– Embriões de caramujo da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> em fase de blástula	29
Figura 10	– Classificação dos embriões <i>Biomphalaria glabrata</i>	29
Figura 11	– Viabilidade celular para o U^{238}	30
Figura 12	– Dano ao DNA induzido pelo elemento U^{238}	32
Figura 13	– Dano ao DNA induzido pelo elemento Cd^{112}	32
Figura 14	– Embriões de <i>B. glabrata</i> após exposição	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados da embriotoxicidade dos elementos Urânio (U) e Cádmiio (Cd)	33
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis Of Variance
IARC	International Agency for Research on Cancer
OMS	Organização Mundial da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
µg	Microgramas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
µL	Microlitros
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DMSO	Dimetilsulfóxido
NaCL	Cloreto de sódio
mM	Milimolar
°C	Graus celsius
<i>Et al</i>	E outros
nm	Nanômetro
DI	Índice de dano
Cd	Cádmio
U	Urânio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	BIOINDICADOR	15
2.2	<i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	15
2.3	OS ELEMENTOS QUÍMICOS E O MEIO AMBIENTE	19
2.3.1	URÂNIO	20
2.3.2	CÁDMIO	20
2.4	<i>VIABILIDADE CELULAR</i>	21
2.5	<i>ENSAIO COMETA ALCALINO</i>	21
2.6	EMBRIOLOGIA DO CARAMUJO <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS CARAMUJOS <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	26
4.2	EXPOSIÇÃO DE CARAMUJOS ADULTOS AOS ELEMENTOS QUÍMICOS	26
4.3	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	27
4.4	GENOTOXICIDADE: ENSAIO COMETA ALCALINO	27
4.4.1	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	28
4.1.2	ANÁLISE DOS DANOS GENÉTICOS	28
4.5	ENSAIO EMBRIOTÓXICO	29
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	30
5.2	ENSAIO COMETA ALCALINO	31
5.3	ENSAIO EMBRIOTÓXICO	33
6	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A presença de elementos metálicos oriundos da agricultura, de áreas industriais e de regiões de ocorrência natural de material radioativo no meio ambiente são fatores responsáveis pelo aumento das quantidades dos metais nestes locais (FRED, 2019). Desta forma, o acúmulo contínuo destes metais representa uma potencial ameaça aos ecossistemas naturais, o que pode resultar no surgimento de diferentes efeitos biológicos nos organismos vivos, como: anomalias reprodutivas, desenvolvimento desordenado das células, efeito teratogênico e aumento da incidência de câncer, comprometendo as gerações futuras (JÍROVÁ *et al.*, 2020).

Dentre esses elementos, destaca-se o urânio (U^{238}), um actínídeo de origem natural que possui três isótopos, sendo o U^{238} (não físsil) o mais abundante, representando mais de 99% dos recursos de urânio disponíveis (BJORKLUND *et al.*, 2020). O elemento pode ter origem natural, pois é encontrado em solos e rochas, sendo detectado em águas subterrâneas. Além disso, possui origens antropogênicas, tendo como principais causas a mineração e fertilizantes fosfatados (MA *et al.*, 2020). A contaminação por este elemento é considerada um problema de saúde pública, devido à sua bioacumulação no meio ambiente e toxicidade aos seres vivos. Exposição a altas concentrações podem acarretar efeitos químicos nocivos, e, quando ingerido acidentalmente, pode acarretar desordens metabólicas, aumentando a incidência de câncer nos ossos e fígado e, em caso de inalação, câncer no pulmão (TIRMARCHE *et al.*, 2021).

O cádmio (Cd^{112}) é um metal pesado não essencial e tóxico, classificado como cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2012). É abundante no meio ambiente, representando risco potencial à saúde humana, bem como aos ecossistemas, visto que sua emissão está relacionada com atividades industriais, incluindo a galvanoplastia e a mineração (ARRUEBARRENA *et al.*, 2023). A ingestão do cádmio, mesmo que em baixos níveis, por um longo período, é capaz de afetar órgãos como rins, pulmão e tecido ósseo, tornando os ossos quebradiços (YAO *et al.*, 2020).

Para determinação da magnitude do dano e dos possíveis impactos correlacionados à presença desses elementos químicos no meio ambiente, são

utilizados bioindicadores, organismos vivos ou seus metabólitos cuja presença determinam a qualidade do ambiente no qual estão inseridos (PEQUENO *et al.*, 2024). Nesse contexto, animais invertebrados, atualmente são considerados modelos de bioindicação devido à elevada sensibilidade e vantagem de detectar a presença de contaminantes metálicos, até mesmo quando estão em baixas quantidades e são rapidamente diluídos em grandes volumes de água, fornecendo informações acerca de suas biodisponibilidades (CAMPOY-DIAZ *et al.*, 2018).

Dentre os invertebrados, o molusco de água doce, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), vem sendo amplamente utilizado como bioindicador. Isso porque possui ampla distribuição geográfica, abrangendo dezesseis estados brasileiros, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, além de apresentar curto ciclo de vida, reprodução durante o ano inteiro, fácil coleta e manutenção em condições laboratoriais (NAKANO *et al.*, 2003; TALLARICO *et al.*, 2014).

Desta forma, além da utilização do animal adulto como modelo biológico para análises ecotoxicológicas de substâncias potencialmente nocivas, seus embriões também têm sido utilizados para avaliar a embriotoxicidade (CAIXETA *et al.*, 2021), pois em seus estágios iniciais, o molusco demonstra expressiva sensibilidade a diversos poluentes (SIQUEIRA *et al.*, 2021).

Os hemócitos, células de defesa do *B. glabrata*, são também, utilizados para análises citotóxicas e genotóxicas, por estarem diretamente expostos às substâncias tóxicas que são absorvidas pelo molusco e circulam na hemolinfa (GRAZEFTE *et al.*, 2008). Para avaliação do dano ao material genético de caramujos expostos a agentes físicos ou químicos, tem sido utilizado o ensaio cometa alcalino, uma técnica sensível, de baixo custo e capaz de detectar quebras na fita de DNA (PEREIRA *et al.*, 2018, França *et al.*, 2022).

Portanto, este trabalho teve como objetivo, utilizar os moluscos *Biomphalaria glabrata* como bioindicador da toxicidade, genotoxicidade e embriotoxicidade do Urânio e Cádmiio em ambientes aquáticos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *BIOINDICADOR*

Bioindicadores são organismos empregados na avaliação e monitoramento da qualidade ambiental, refletindo as condições do ecossistema onde habitam. Eles apresentam sensibilidade às variações ambientais, fornecendo informações importantes sobre o ecossistema. Esses organismos são capazes de refletir níveis de contaminação, variações climáticas, bem como outros aspectos ambientais (MANZOOOR *et al.*, 2021).

Os bioindicadores estão amplamente distribuídos em diversas áreas e níveis tróficos, fornecendo informações relevantes para avaliação de riscos ambientais. É recomendado o uso de um único táxon como indicador, destacando características como ampla distribuição e sensibilidade a mudanças no habitat, o que torna fundamental a obtenção de conhecimentos científicos. Assim, para utilizar bioindicadores é necessário ter conhecimento acerca das vantagens em relação a utilização de métodos convencionais, as quais são: baixo custo, suscetibilidade a uma ampla variedade de agentes estressores e monitoramento ambiental em ampla escala (PRESTES, VINCENZI, 2019).

Diversas espécies de animais têm sido apontadas como bioindicadores da qualidade ambiental em ensaios ecotoxicológicos para a detecção de elementos químicos que apresentam potencial tóxico no ambiente aquático. Por se mostrar um potencial substituto de animais vertebrados, invertebrados vem tomando espaço em ensaios de ecotoxicidade, levando em consideração questões de bioética e menor custo. Entre eles, o molusco de água doce *B. glabrata* se destaca como modelo bioindicador por ser facilmente coletado e identificado, além de apresentar ampla distribuição no ecossistema e capacidade de bioacumular essas substâncias em seus tecidos moles (BAT; OZTEKIN, 2016; LIMA *et al.*, 2019a; 2019b).

2.2 *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Os invertebrados representam grande parte das espécies presentes nos ecossistemas aquáticos e têm sido utilizados em ensaios ecotoxicológicos para avaliar os efeitos de possíveis contaminantes aquáticos, pois possuem elevada

sensibilidade a agentes potencialmente nocivos e tem grande relevância na teia trófica, o que demonstra que o animal é um bom modelo para estudos de biomonitoramento (TALLARICO, 2014).

O molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* (figura 1) pertence ao reino *Animalia*, filo *Mollusca*, classe *Gastropoda*, subclasse *Pulmonata*, ordem *Basommatophora*, família *Planorbidae* e gênero *Biomphalaria*. (REY, 2015; NEVES *et al.*, 2016).

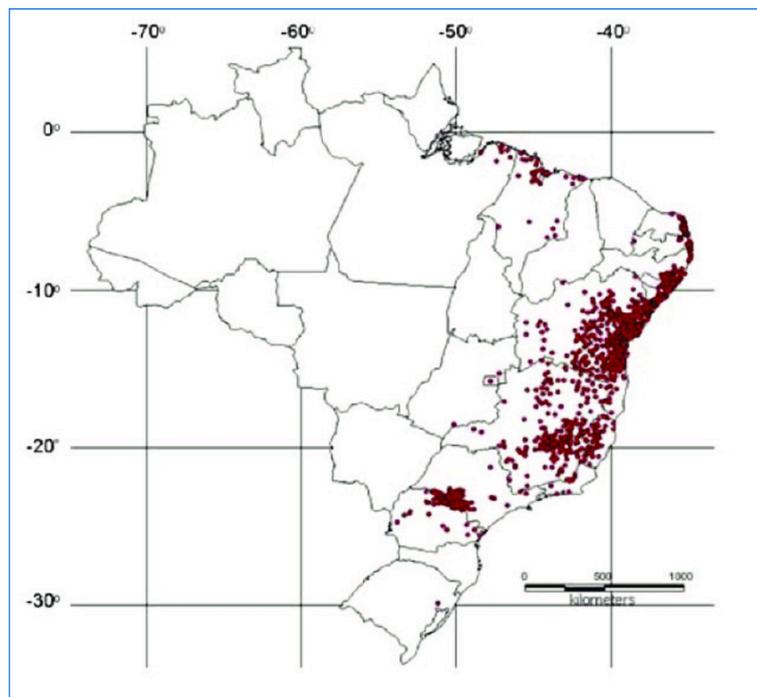
Figura 1. Molusco adulto da espécie *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: Autora, 2025.

O *B. glabrata* tem importância médica por ser hospedeiro intermediário do trematódeo *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose, doença endêmica no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2018). Os moluscos desta espécie têm sido amplamente estudados devido à sua grande distribuição geográfica (figura 2), facilidade de coleta e manutenção em condições laboratoriais, além de sua capacidade de reprodução durante meses (Morais *et al.*, 2022).

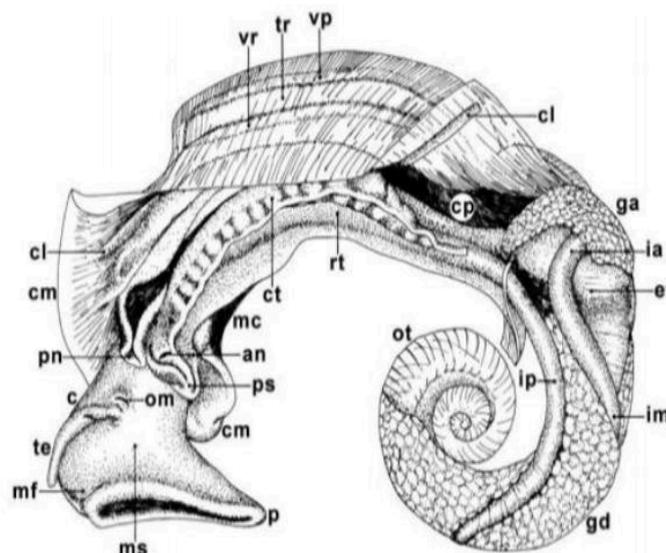
Figura 2. Distribuição geográfica do caramujo *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: Brasil, 2014 (Adaptado)

Além disso, esses invertebrados têm um ciclo de vida de aproximadamente 12 meses e atingem a maturidade sexual, por volta dos dois meses em que passam a ovipor desovas plúrioovuladas (NEVES *et al.*, 2016). No indivíduo adulto, sua concha, a qual possui a função de proteger o corpo do caramujo e suas vísceras (figura 3) possui formato planispiral, medindo de dois a quatro centímetros de diâmetro, sendo cinco a oito milímetros de espessura e seis a sete giros (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008). As características químicas da água, bem como a disponibilidade de cálcio, essencial para a biomineralização da concha, influenciam na sua coloração, que pode variar de castanho claro a marrom (SILVA *et al.*, 2006).

Figura 3. órgãos internos do molusco *Biomphalaria glabrata* adulto.



Cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), Massa cefalopodal (ms), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pneumóstoma (pn), pseudobrânquia (ps), abertura anal (an), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), veia renal (vr), músculo columelar (mc), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).

Fonte: adaptada de Carvalho, 2014

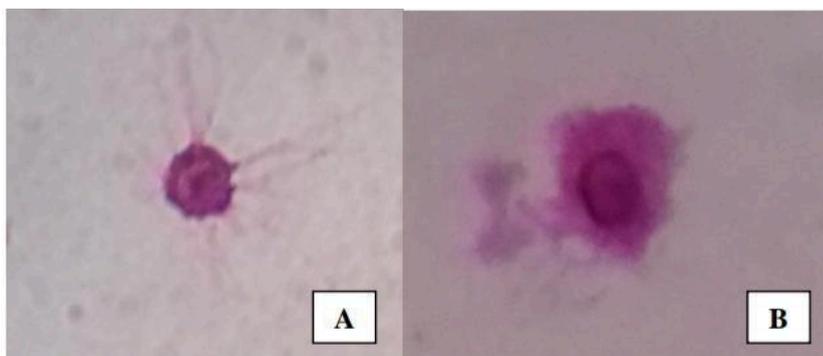
O sistema circulatório do *B. glabrata* é composto pelo coração que apresenta duas cavidades: o ventrículo e a aurícula, além de ser do tipo aberto, utilizando a hemolinfa como fluido de transporte, a qual irriga diretamente os tecidos através dos vasos sanguíneos, sendo posteriormente drenada pelos vasos, retornando para o coração (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008). A hemolinfa corresponde ao sangue do molusco, sendo constituída por elementos amebóides (hemócitos), cloreto de sódio, plasma rico em água, bicarbonatos e hemoglobina dissolvida, a qual atua como pigmento na célula e contém ferro, favorecendo a utilização do oxigênio em condições de baixa tensão (REY, 2015; PESSÔA; MARTINS, 2011).

Os hemócitos, células presentes na hemolinfa com origem multicêntrica, possuem papel fundamental no sistema de defesa do caramujo e são observados em diversos tecidos hematopoiéticos (SOUZA; ANDRADE, 2006). Essas células apresentam morfologia e conteúdo enzimático variados, sendo compostas por diferentes subpopulações que desempenham distintos tipos de resposta imune. Neste sentido, são compostos por pelo menos duas populações: granulócitos (figura

4-A) e hialinócitos (figura 4-B). Os granulócitos são as maiores células presentes na hemolinfa com cerca de 7-16 μm de diâmetro, grânulos basofílicos citoplasmáticos denominados de lisossomos e semelhanças com macrófagos de animais vertebrados, realizando a fagocitose, bem como a imobilização de parasitas por meio de encapsulamento (REY, 2015). Por sua vez, os hialinócitos, possuem tamanho menor que os granulócitos, com diâmetro variando entre 5 a 8 μm , alta relação núcleo-citoplasma, contorno circular quando entram em contato com superfícies e não apresentam grânulos e possuem escassos lisossomos (CAVALCANTI *et al.*, 2012; PILA *et al.*, 2016; LIMA, 2017).

Figura 4. Hemócitos de *B. glabrata*, sendo (A) Granulócito e (B) Hialinócito.

Aumento 100x.



Fonte: Morais, 2022.

2.3 Os ELEMENTOS QUÍMICOS E O MEIO AMBIENTE

Os elementos químicos estão presentes na natureza, sendo apenas 25 considerados essenciais, constituindo os organismos vivos. Os demais 88 elementos encontram-se disponíveis no ambiente, podendo ser incorporados aos sistemas biológicos (LÓPEZ-DOVAL *et al.*, 2012). Dentre os elementos químicos, destaca-se a classe dos metais, que, apesar de serem encontrados naturalmente no meio ambiente, quando em altas concentrações, podem provocar danos ao organismo vivo e ao ecossistema. Entre os metais, destacam-se o U^{238} e o C^{112} , elementos estudados no trabalho. Nesse contexto, concentrações elevadas de contaminantes, incluindo elementos químicos, podem comprometer a qualidade da água, impactando negativamente organismos sensíveis e prejudicando o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (AURELIANO *et al.*, 2012)

2.3.1 URÂNIO

O urânio é um actínídeo que apresenta três isótopos: U^{238} , U^{235} e U^{234} , com diferentes meias-vidas: $2,455 \times 10^5$ anos para o U^{238} , $7,038 \times 10^8$ anos para o U^{235} e $4,468 \times 10^9$ anos para o U^{234} , indicando que sua radioatividade no ambiente natural é extremamente baixa (BJORKLUND *et al.*, 2020). Esse elemento pode ter origem natural, sendo encontrado em solos e rochas, além de ser detectado em águas subterrâneas. No entanto, também pode ser liberado no meio ambiente por fontes antropogênicas, principalmente devido a atividades como agricultura e mineração, o que altera sua distribuição geográfica (MA *et al.*, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2021), em áreas contaminadas por urânio, a população é exposta principalmente por meio da ingestão de alimentos e água potável. Dessa forma, o corpo humano possui naturalmente 90 μg de urânio, enquanto sua ingestão diária por meio de alimentos varia entre 0,7 e 15,3 μg , aproximadamente. Entretanto, o elemento pode se acumular no organismo humano por meio da inalação de aerossóis e gases contendo urânio, ingestão de água ou alimentos contaminados e absorção pela pele. A exposição excessiva, tanto aguda quanto crônica, pode causar danos a órgãos como rins, ossos, fígado, cérebro e pulmões, além de estar associada a efeitos nocivos, como câncer nos ossos, fígado e pulmões. Isso evidencia sua capacidade de bioacumulação no ambiente, bem como sua toxicidade para os seres vivos (MA *et al.*, 2020; TIRMARCHE *et al.*, 2021).

2.3.2 CÁDMIO

As atividades antropogênicas promovem a liberação de metais pesados, que possuem efeitos poluentes, se disseminando nos ecossistemas aquáticos. O cádmio é um dos que apresentam maiores riscos, pois é um metal altamente tóxico, que possui capacidade de bioacumular na cadeia alimentar, o que representa riscos aos ecossistemas, bem como à saúde humana (YAO *et al.*, 2020). O elemento é capaz de contaminar o meio ambiente por meio da água, ar e solo, o que tem gerado crescente preocupação (ARRUEBARRENA *et al.*, 2023).

O elemento é classificado como cancerígeno pela Agência Internacional de

Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2012). Assim, possui efeitos teratogênicos, carcinogênicos e nefrotóxicos, os quais ocorrem por consequência da sua facilidade de absorção, já que está presente em alimentos e bebidas contaminados. Nesse contexto, atividades industriais, como galvanoplastia e mineração, contribuem para a liberação deste metal, de modo que sua ingestão, mesmo em baixos níveis e por um longo período, pode afetar órgãos como rins, pulmões e tecido ósseo (CDC, 2024; YAO *et al.*, 2020).

2.4 VIABILIDADE CELULAR

O corante Azul de Tripán é um dos métodos tradicionais utilizados para avaliar a viabilidade celular, permitindo a identificação de células inviáveis. Durante o processo, as células são contadas e analisadas com o auxílio de um hemocítmetro. As células inviáveis, por terem a membrana danificada, facilitam a entrada do corante em seu interior. Em contraste, as células viáveis impedem esse fluxo, pois a membrana celular permanece intacta e é impermeável ao corante (LOUIS; SIEGEL, 2011).

2.5 ENSAIO COMETA ALCALINO

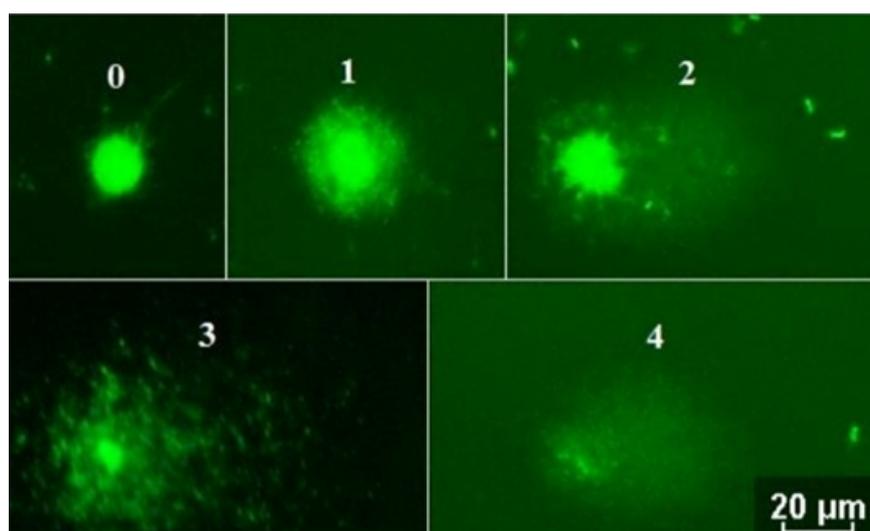
A ecotoxicologia é a ciência que estuda os contaminantes presentes na biosfera e seus impactos sobre seus componentes e tem o objetivo de prever e compreender os efeitos da exposição a contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (GIULIO; NEWMAN *et al.*, 2019). Ela analisa os impactos das substâncias sobre os organismos vivos e sua interação com o ambiente, levando em consideração exposições de curto e longo prazo (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Radicais livres, radiação ionizantes, agentes biológicos e produtos químicos são capazes de induzir danos oxidativos no DNA, podendo resultar em quebras nas suas fitas duplas. Os mecanismos de reparo celular podem corrigir essas mutações, ou as células podem entrar em apoptose (morte celular programada). No entanto, algumas mutações podem se tornar permanentes e resultar no surgimento de câncer, indicando que a substância é capaz de induzir a formação de células cancerígenas, sendo chamada de carcinogênica (SINGH *et al.*, 1988).

Para avaliação da genotoxicidade é empregado o ensaio cometa alcalino é uma técnica sensível, a qual pode ser usada para testes de monitoramento

ambiental, destacando-se devido seu baixo custo (GAJSKI *et al.*, 2019). Na análise dos danos no material genético de *B. glabrata*, são utilizadas poucas quantidades de hemolinfa do caramujo. Nesse sentido, os hemócitos - células de defesa da *B. glabrata* - são escolhidos para a análise, pois estão diretamente expostos às substâncias tóxicas que circulam na hemolinfa e são sensíveis a agentes danosos ao DNA do animal (VILLELA *et al.*, 2007; GRAZEFEE *et al.*, 2008). Os danos no DNA são mensurados conforme o grau de alterações (figura 5) que ocorrem no material genético, bem como a dos fragmentos de DNA lesados que migram durante a eletroforese, demonstrando semelhança com a cauda de um cometa (LEBOUTE *et al.*, 2003).

Figura 5. Graus de danos ao DNA de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: Morais, 2022.

Nesse sentido, a categoria 0 refere-se à ausência de danos, enquanto as categorias de 1 a 4 indicam níveis progressivos de alteração no DNA, com maior gravidade à medida que a numeração aumenta. Por isso, o método se destaca como uma técnica promissora para avaliação de danos genotóxicos em estudos de biomonitoramento.

Conforme Depledge (1998), embora seja conhecido que poluentes possuem capacidade de provocar danos ao material genético de populações, a identificação desses efeitos, bem como a determinação de sua relevância ecológica ainda

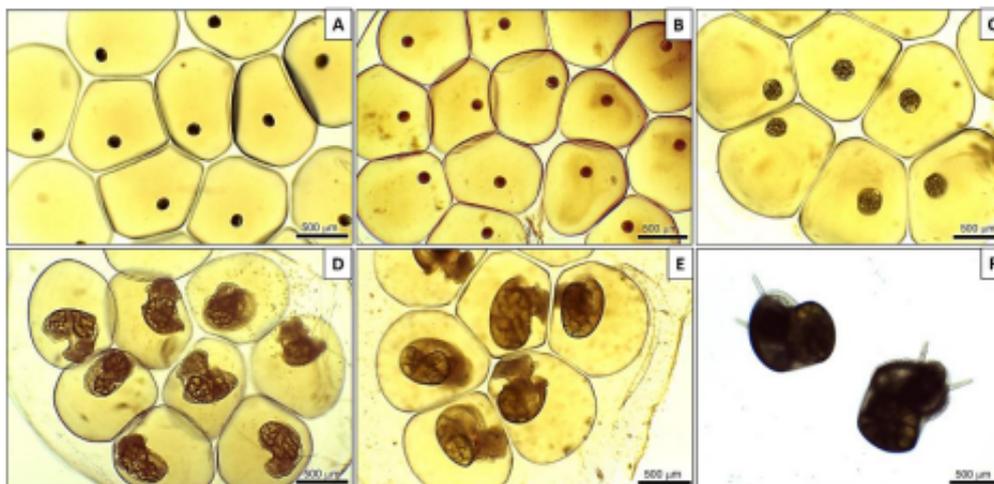
representam um desafio. Entretanto, é fundamental identificar danos no DNA em testes *in vivo*, pois quanto maior a concentração de substâncias genotóxicas, maiores os riscos para a saúde humana.

2.6 EMBRIOLOGIA DO CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABRATA*

As fases embrionárias do caramujo *B. glabrata* exibem grande sensibilidade a uma ampla variedade de poluentes (ARAÚJO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2019a; SIQUEIRA *et al.*, 2020; 2021). Isso porque a espécie é hermafrodita, possuindo uma elevada atividade reprodutiva, com capacidade de oviposição durante o ano todo, a qual ocorre usualmente à noite em superfícies próximas às margens de rios, galhos flutuantes ou folhas. O período embrionário dura em média de seis a oito dias, enquanto sua eclosão ocorre entre sete e dez dias. Em condições favoráveis, cada desova pode conter até 100 ovos, os quais medem aproximadamente 100 µm de diâmetro e, quando estão no ambiente, esses ovos passam por sucessivas clivagens mitóticas até alcançarem o primeiro estágio (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008).

As divisões mitóticas têm início após a fertilização dos ovos e continuam até atingirem a primeira fase embrionária, chamada de blástula (10^a e 23^a horas) (figura 6-A), caracterizada por proliferações celulares. A fase seguinte é denominada gástrula (24-39 horas) (figura 6-B), na qual ocorre o início das movimentações celulares, bem como diferenciação e crescimento. No estágio de trocófora (40 a 90 horas) (figura 6-C), ocorre a organogênese, dando origem a região cefálica e a boca. Entre 96 e 120 horas da primeira clivagem, ocorre o estágio de véliger (figura 6-D), caracterizado por intensa movimentação dentro do ovo e pela formação quase completa do molusco jovem. Após 120 horas, ocorre a fase de *hippo stage* (figura 6-E), com formação da concha, bem como tentáculos. Por fim, a eclosão (figura 6-F) das desovas ocorre aproximadamente seis dias após a primeira clivagem. (CAMEY; VERDONK, 1969; KAWANO; OKAZAKI; RE, 1992; KAWANO *et al.*, 2004; WATANABE, 2008).

Figura 6. Fases do desenvolvimento de *Biomphalaria glabrata*.



A: embriões em blástula (10^a e 23^a h); **B:** embriões em gástrula (24^a a 39^a h); **C:** embriões em trocófora (40^a e 90^a h); **D:** embriões em véliger (96^a e 120^a h); **E:** embriões em *hippo stage* (após 120 h); **F:** caramujos recém eclodidos.

Fonte: Caixeta, 2020.

Para a realização de testes de toxicidade aguda com embriões são adotados períodos curtos de exposição, nos quais são avaliados parâmetros de mutagenicidade, como malformações embrionárias e mortalidade, resultantes de alterações em células germinativas. (NAKANO, *et al.*, 2003; FIGUEIREDO, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar os moluscos *Biomphalaria glabrata* como bioindicador da toxicidade, genotoxicidade e embriotoxicidade do urânio e cádmio em ambientes aquáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar toxicidade por meio da análise da viabilidade celular de hemócitos de *B. glabrata* expostos aos metais urânio e cádmio;
- Analisar a genotoxicidade dos elementos urânio e cádmio sobre caramujos adultos de *B. glabrata*, por meio do ensaio cometa alcalino;
- Avaliar os efeitos tóxicos dos elementos urânio e cádmio sobre os embriões no estágio blástula de *B. glabrata*.

4 METODOLOGIA

4.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS CARAMUJOS *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Foram utilizados moluscos adultos pigmentados da espécie *B. glabrata*, medindo entre 10-14 mm de diâmetro de concha, oriundos do moluscário do Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (figura 7), onde foram alimentados semanalmente com alface (*Lactuca sativa*).

Figura 7- Tanques de criação do molusco *Biomphalaria glabrata* do moluscário do Laboratório de Radiobiologia (DBR-UFPE).



Fonte: Autora, 2023.

4.2 EXPOSIÇÃO DE CARAMUJOS ADULTOS AOS ELEMENTOS QUÍMICOS

Para a avaliação da toxicidade e genotoxicidade, foram utilizados sete espécimes de moluscos adultos para cada elemento e concentração, totalizando 35 animais. Assim, os animais foram expostos por 48 h em recipientes de vidro com capacidade para 60 mL, com disposição dos grupos da seguinte maneira: controle negativo com água filtrada e decolorada, controle positivo com metanossulfonato de metila (MMS 0,2 mM) e os grupos experimentais nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L para U^{238} e Cd^{112} . A escolha das concentrações seguiu os padrões aceitáveis

para água doce estabelecidos pela resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

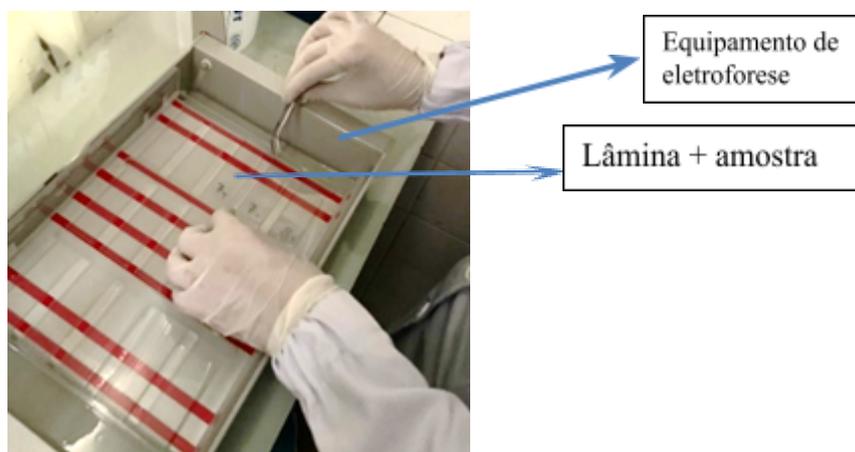
4.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em hemócitos dos moluscos expostos (n=7) e não expostos (n=7) a diferentes concentrações de urânio e cádmio, bem como ao controle negativo (água filtrada e dechlorada). Foram coletados 20µL de hemolinfa de cada molusco teste e, em seguida, adicionado o corante azul de trypan 0,04% (1:2). Em seguida, 10µL desta solução foram colocados na câmara de Neubauer para a realização da contagem das células. As células viáveis apresentam-se transparentes, enquanto as células inviáveis tornam-se azuis, por absorverem o corante, devido a danos na membrana celular (LOUIS, SIEGEL, 2011; WACZUK *et al.* 2015).

4.4 GENOTOXICIDADE: ENSAIO COMETA ALCALINO

Após a exposição dos moluscos adultos, aos metais estudados, foi realizado o Ensaio Cometa Alcalino seguindo o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988) com modificações. Assim, 100 µL de hemolinfa de *B. glabrata* foram coletados e homogeneizados com agarose de baixo ponto de fusão (1%). Esse homogeneizado foi depositado sobre uma lâmina de microscópio, previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) dissolvida PBS (Ph 7,4). Em seguida a lâmina foi coberta por uma lamínula e mantida a 4 °C por dez minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 24 horas a 4 °C. Passado este tempo as lâminas com as amostras foram submetidas a uma eletroforese horizontal (figura 8), contendo uma solução de tampão alcalino pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM), por 20 minutos. A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: 0,74 V/cm e 300 mA por 20 minutos a 4 °C. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) por 15 minutos, seguida de fixação em álcool absoluto por 10 minutos.

Figura 8. Equipamento de eletroforese horizontal com lâminas com agarose e amostras de hemolinfa.



Fonte: Autora, 2024.

4.4.1 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Nos procedimentos seguintes, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de SYBR safe (invitrogen) (1:500) e, por fim, analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm.

4.1.2 ANÁLISE DOS DANOS GENÉTICOS

As análises dos danos ao DNA seguiram a metodologia de Collins *et al.* (2008), sendo classificados em cinco categorias (0-4), de forma que a categoria 0 refere-se à ausência de danos, enquanto as categorias de 1 a 4 indicam que houve danos no material genético em níveis crescentes, com maior gravidade à medida que a numeração aumenta (Figura 5). Para determinar o índice de danos (DI), utilizou-se a fórmula:

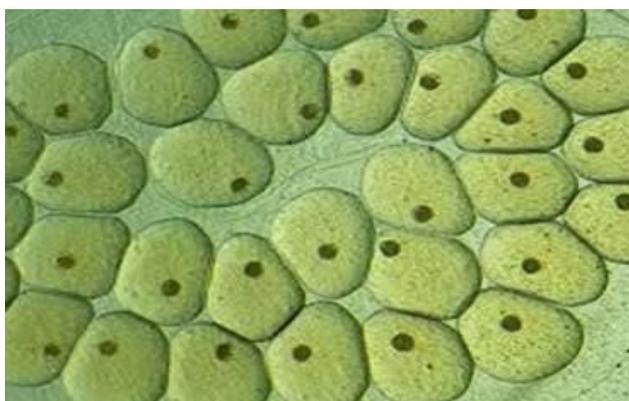
$$ID = 0. (n_0) + 1. (n_1) + 2. (n_2) + 3. (n_3) + 4. (n_4) \quad (1)$$

Onde: n = número de cometas quanto à classe.

4.5 ENSAIO EMBRIOTÓXICO

Para o ensaio embriotóxico, 100 embriões em estágio de blástula (figura 9) foram coletados e expostos em placas de Petri por 48 horas ao controle positivo, com niclosamida na concentração de 1 mg/L, controle negativo, com água filtrada e dechlorada e aos elementos químicos U^{238} e Cd^{112} , ambos nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L.

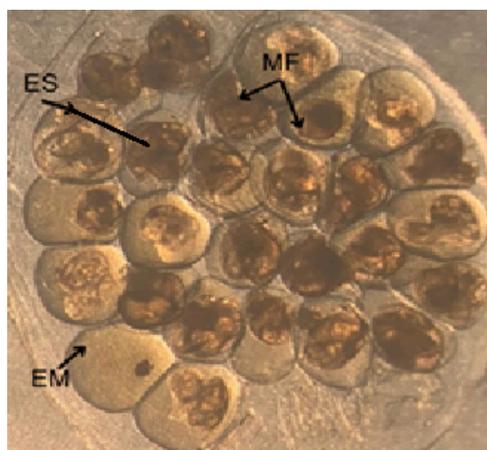
Figura 9. Embriões de caramujo da espécie *B. glabrata* em fase de blástula.



Fonte: Autora, 2024.

Com a finalidade de verificar os danos que esses elementos podem causar, após a exposição, os embriões foram observados durante 7 dias, com auxílio de um microscópio estereoscópico, para classificação dos embriões como viáveis, os quais eclodiram normalmente, e inviáveis (malformados ou mortos) (figura 10) (AGUIAR *et al.*, 2022). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Figura 10. Classificação dos embriões de *Biomphalaria glabrata*.



ES: embrião saudável; MF: embrião malformado; EM: embrião morto

Fonte: Autora, 2024.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

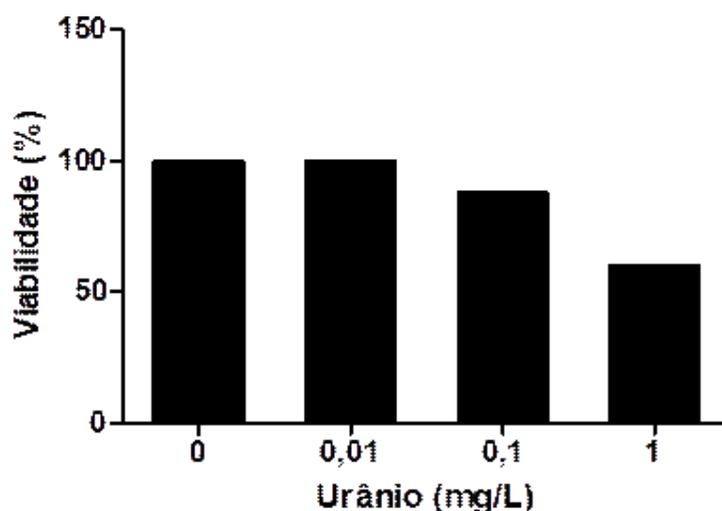
Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5. Para comparação entre grupos, utilizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni como pós-teste entre pares. As comparações entre os grupos foram realizadas com suas respectivas médias e desvios padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A figura 11 mostra o resultado do teste de viabilidade celular dos hemócitos dos moluscos adultos *B.glabrata* expostos às concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L do U^{238} , nas quais foram observados 100%, 88% e 60% de hemócitos viáveis, respectivamente.

Figura 11. Viabilidade celular para o U^{238} .



A exposição ao elemento cádmio apresentou 100% de viabilidade em todas as concentrações testadas. Segundo o protocolo internacional para testes

citotóxicos, criado pela ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009), os ensaios são classificados como citotóxicos quando demonstram taxas de células viáveis inferiores a 70%. Portanto, o resultado obtido na exposição à maior concentração de urânio (1 mg/L) apresentou efeito citotóxico, pois obteve 60% de viabilidade celular dos hemócitos. Dados semelhantes foram encontrados por Morais *et al.* (2022), em que células hemocitárias de *B. glabrata* expostas ao urânio de origem natural, presentes em água de poço de regiões de minério uranífero não apresentaram citotoxicidade.

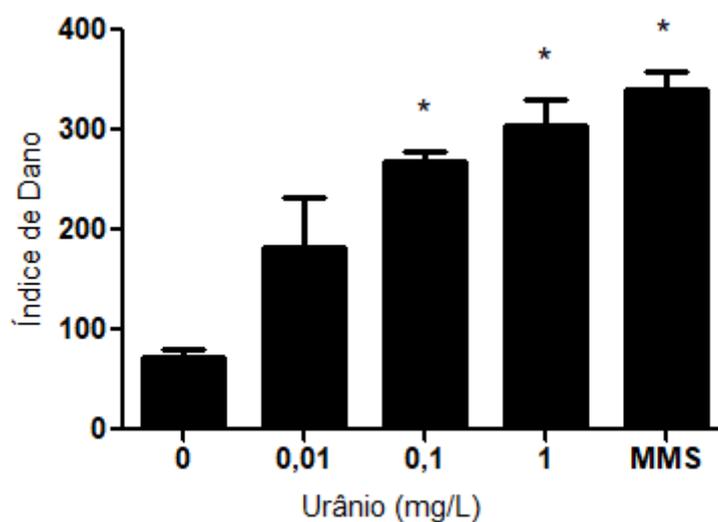
Estudo realizado por Siqueira *et al.*, (2021) avaliou o potencial citotóxico do lodo doméstico sobre caramujos *B. glabrata*. Após 48 horas de exposição, foram identificadas concentrações de aproximadamente 2 mg/kg de urânio e aproximadamente 0,7 mg/kg de cádmio, entre outros elementos químicos. Os resultados da viabilidade celular dos hemócitos coletados dos moluscos expostos ao lodo doméstico foram semelhantes aos resultados encontrados no presente trabalho, ou seja, valores altos de viabilidade celular.

Este ensaio de viabilidade celular possibilitou a realização dos testes de genotoxicidade, por meio do ensaio cometa alcalino.

5.2 ENSAIO COMETA ALCALINO

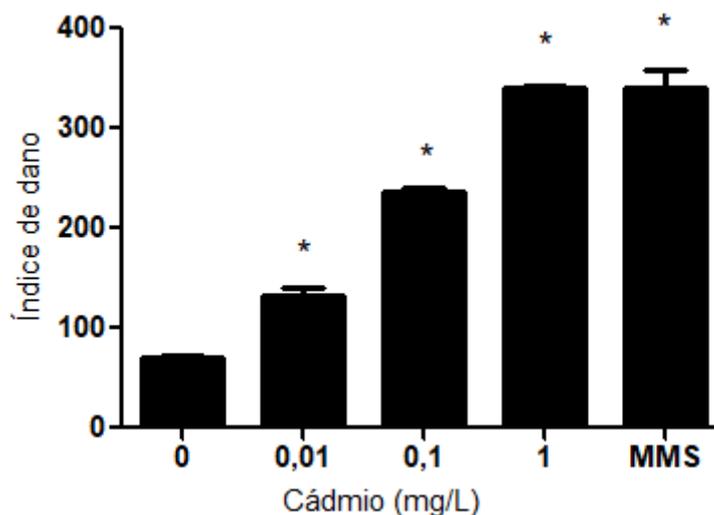
Durante o período de exposição, não houve registro de mortalidade de moluscos adultos expostos e não expostos ao U^{238} e Cd^{112} . No experimento com U^{238} (figura 12), o grupo controle negativo apresentou índice de dano (ID) de 72,67, o grupo controle positivo apresentou ID de 339, enquanto as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L resultaram em índices de danos de 183; 267,33 e 304,67, respectivamente.

Figura 12. Dano ao DNA induzido pelo elemento U^{238} .



Para o elemento Cd^{112} (figura 13), o grupo controle negativo registrou um ID de 69,33, o grupo controle positivo apresentou ID de 339, enquanto para as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L, o ID foi de 132,67; 237,33 e 339,33, respectivamente.

Figura 13. Dano ao DNA induzido pelo elemento Cd^{112} .



A genotoxicidade refere-se à capacidade que uma substância ou amostra possui de provocar alterações na estrutura do DNA, podendo impactar processos vitais de maneira reversível ou irreversível (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; SILVA,

2008). Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho (Figura 12 e 13) revelaram que ambos os elementos testados, apresentaram genotoxicidade em todas as concentrações testadas, apresentando uma tendência dose-dependente, ou seja, o aumento das concentrações resultou em uma elevação dos danos ao DNA.

Estudo realizado com *B. glabrata* exposto ao lodo de origem doméstica e industrial apresentaram efeitos genotóxicos. Autores sugerem, que os efeitos estão relacionados com a presença de elementos químicos na composição do lodo (SIQUEIRA *et al.*, 2021). Além disso, pesquisa com *B. glabrata* expostos a urânio natural, proveniente de água de poços artesianos em residências localizadas em região com presença de minério uranífero, identificou danos no material genético dos animais expostos, utilizando o ensaio cometa como metodologia experimental (MORAIS *et al.*, 2022). Estes dados corroboram as evidências encontradas no presente trabalho.

5.3 ENSAIO EMBRIOTÓXICO

Na tabela 1 pode-se observar os resultados dos testes de embriotoxicidade dos embriões de *B. glabrata* expostos aos elementos urânio e cádmio.

Tabela 1- Resultados da embriotoxicidade dos elementos urânio (U) e cádmio (Cd).

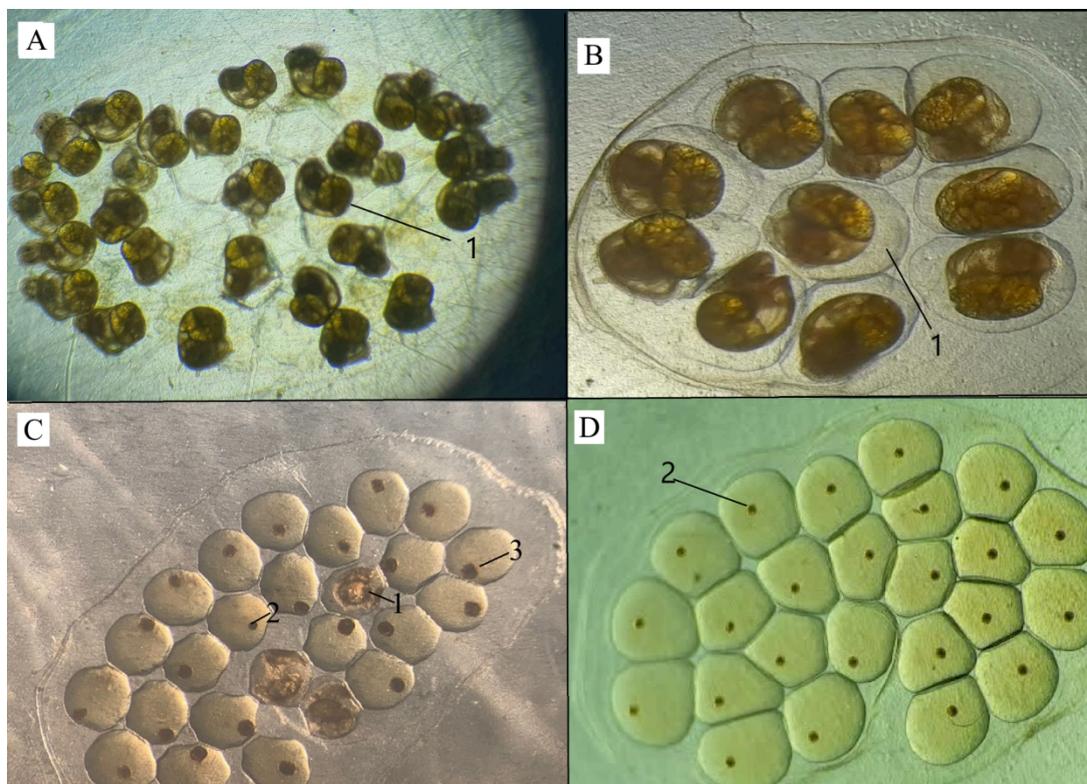
Concentração [mg/L]	Embriões viáveis		Embriões inviáveis	
	U	Cd	U	Cd
C-	100	100	0	0
0,01	100	100	0	0
0,1	100	100	0	0
1	100	0	0	100

Os embriões expostos ao elemento químico U^{238} apresentaram 100% de viabilidade para todas as concentrações testadas. Para a exposição ao elemento Cd^{112} , foi observado 100% de viabilidade para as concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L. Por outro lado, embriões expostos à concentração de 1mg/L apresentaram 100% de inviabilidade, com 97% de malformações e 3% de mortalidade.

Na figura 14 pode-se observar os embriões expostos aos metais e os

diferentes efeitos morfológicos.

Figura 14. Embriões de *Biomphalaria glabrata* após exposição.



(A) controle negativo, **(B)** Urânio, **(C)** Cádmio e **(D)** Controle Positivo, sendo 1: embrião vivo malformado; 2: embrião morto e; 3: embrião com atraso de desenvolvimento.

Segundo Batista *et al.* (2022), os embriões de *B. glabrata* possuem sensibilidade aos elementos capazes de penetrar a membrana de sua cápsula ovígera. Portanto, pode-se sugerir que a viabilidade dos embriões a exposição ao U^{238} ocorreu pela não absorção do elemento pela massa ovígera, ou seja, o U^{238} não conseguiu ultrapassar a membrana que protege os embriões. A embriotoxicidade do Cd^{112} , por sua vez, pode estar relacionada com a concentração do elemento, bem como o tempo de exposição. Estes efeitos também podem ser notados na avaliação da viabilidade celular dos hemócitos dos moluscos expostos, item está no item 5.1 deste trabalho.

Martín *et al.*, (2009) testaram os efeitos de diferentes concentrações de cádmio, chumbo e arsênio sobre embriões de *B. glabrata*, levando em consideração parâmetros como número de oviposições, tempo de eclosão, bem como sobrevivência embrionária. Os resultados mostraram que os elementos foram

capazes de prolongar o tempo de eclosão e diminuir a sobrevivência embrionária. Estudos realizados por Lima *et al.* (2021), por meio da avaliação do potencial embriotóxico das águas do rio Capibaribe, constataram anormalidades nos embriões de caramujos de *B. glabrata*, tais como malformações e mortes. Estudos realizados por Araújo *et al.* (2021) sugerem que embriões que apresentam malformações têm dificuldades para eclodir ou não sobrevivem após a eclosão. Portanto, estes estudos confirmam a sensibilidade dos moluscos adultos e na fase embrionária de *B. glabrata* expostos a agentes químicos, corroborando com os resultados apresentados nesta pesquisa.

6 CONCLUSÕES

- O U^{238} apresentou citotoxicidade sobre os hemócitos do caramujo *B. glabrata*, enquanto, sob as mesmas condições experimentais, o Cd^{112} não demonstrou citotoxicidade celular.;
- Os elementos químicos U^{238} e Cd^{112} causaram genotoxicidade nos hemócitos dos moluscos adultos expostos às concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L;
- O U^{238} não apresentou embriotoxicidade, enquanto o Cd^{112} foi responsável pelo surgimento de malformações e morte embrionária para a concentração de 1 mg/L, causando 100% de viabilidade embrionária;

Dessa forma, pode-se concluir que utilizar o molusco *B. glabrata* poderá auxiliar na prevenção e no controle da presença dos metais Cd^{112} e U^{238} em ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS

- AURELIANO, M. et al. Os semimetais na origem e evolução da vida. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1062–1068, 2012.
- AGUIAR, T. W. DE A. et al., Effect of Bauhinia monandra Kurz Leaf Preparations on Embryonic Stages and Adult Snails of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), Schistosoma mansoni Cercariae and Toxicity in Artemia salina. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4993, 1 jan. 2022.
- AMARAL, R. S.; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. 180 p.
- ARAÚJO, H. D. et al., Potassium usnate toxicity Against embryonic stages of the snail *Biomphalaria glabrata* and Schistosoma mansoni cercariae. **Acta Tropica**, v. 188, p. 132-137, 2018.
- ARRUEBARRENA, M. A. et al. Mechanisms of Cadmium Neurotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16558, 21 nov. 2023.
- BAT, L.; OZTEKIN, H. C. Heavy metals in Mytilus galloprovincialis, Rapana venosa and Eriphia verrucosa from the Black Sea coasts of Turkey as bioindicators of pollution. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 13, n. 9, p. 715–728, 2016.
- BATISTA, J. J. et al. Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of saline extract and fraction of Parkia pendula seeds in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818 – intermediate host) and cercaricide activity against the infectious agent of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106312, abr. 2022.
- BJØRKLUND, G. et al. Uranium in drinking water: a public health threat. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1551–1560, 17 fev. 2020.
- CAIXETA, M. B. Toxicidade reprodutiva e resposta de múltiplos biomarcadores no caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) após exposição crônica às nanopartículas de óxido de ferro (γ -Fe₂O₃) funcionalizadas com ácido glucônico. 2020. 166 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.
- CAIXETA MB, Araújo PS, Gonçalves BB et al., Toxicidade de nanomateriais de engenharia para caracóis aquáticos e terrestres: uma revisão cienciométrica e sistemática. **Chemosphere** 260:127654. 2021.
- CAMEY, T.; VERDONK, N. H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 20, n. 1, p. 93–121, 1969.
- CAMPOY-DIAZ, A. D. et al. Bioindication of mercury, arsenic and uranium in the

apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Bioconcentration and depuration in tissues and symbiotic corpuscles. **Chemosphere**, v. 196, p. 196–205, abr. 2018.

CARVALHO, O. D. S. *et al.*, Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. 1-9, 2018.

CARVALHO, O. S.; PASSOS, L. K. J.; MENDONÇA, C. L. G. F. D.; CARDOSO, P. C.M.; CALDEIRA, R. L. Moluscos brasileiros de importância médica. In **Moluscos brasileiros de importância médica**, 2014, 94 p.

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

CAVALCANTI, M. G. S. *et al.* Morphological characterization of hemocytes from CDC. Substance Priority List. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/programs/substance-priority-list.html?CDC_AAref_Val=https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>.

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 17 fev. 2008. de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina*, 2011. 88 p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

DEPLEDGE, M. H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, v. 23, p. 109-122, 1998 Editora: Guanabara Koogan S.A., 2011.

Embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar: 20. ed. Rio de Janeiro, Editora: **FIOCRUZ**, 2008, 347 p.

FIGUEIREDO, Eliane Souza. Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Indigofera suffruticosa* sobre *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina*. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1266/1/arquivo3121_1.pdf.

França WWM, *et al.*, Toxic, cytotoxic and genotoxic effect of plumbagin in the developmental stages of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818-intermediate host) and cercaricidal activity against the infectious agent of *schistosomiasis mansoni*. **Pest Manag Sci**. 2022 Dec;78(12):5172-5183. doi: 10.1002/ps.7136. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36053991.

GAJSKI, G. *et al.* The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 781, p.

130–164, jul. 2019.

GIULIO, R.T.; NEWMAN, M.C. Ecotoxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology - **The Basic Science of Poisons**. 9ª Ed. 2019.

GRAZEFTE, V. S. et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 654, n. 1, p. 58–63, 22 maio 2008.

GRAZEFTE, V. S.; et al., E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 654, p. 58-63, 2008.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices** — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3o Ed, ISO, p. 34, 2009.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of medical devices — Part 5: **Tests for in vitro cytotoxicity**. 3o Ed, ISO, p. 34, 2009.

JÍROVÁ, J. et al. Incidence of spontaneous abortions and congenital anomalies in the vicinity of a uranium processing plant. *Central European Journal of Public Health*, v. 28, n. 1, p. 44–47, 30 mar. 2020.

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

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

LEBOUTE, A. P. M.; SILVA, J. Toxicologia molecular. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003

LIMA, M. V. et al., Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe Quantum Dots to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 38, p. 2128-2136, 2019a.

LIMA, M. V. et al., Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe Quantum Dots to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 38, p. 2128-2136, 2019a.

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

LIMA, Maíra de Vasconcelos. **Avaliação da toxicidade de suspensões de pontos quânticos em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*** (SAY, 1818), 2017. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de

Pernambuco, Recife, 2017.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 7–12, 2011.

MA, M. et al. Emerging health risks and underlying toxicological mechanisms of uranium contamination: Lessons from the past two decades. **Environment International**, v. 145, p. 106107, 1 dez. 2020.

MANZOOR, M. et al. Bio-Indicator Species and Their Role in Monitoring Water Pollution. Apple Academic Press eBooks, p. 321–347, 4 nov. 2021.

MARTÍN et al. Efeito do cádmio, chumbo e arsênico na oviposição, eclosão e sobrevivência embrionária de *Biomphalaria glabrata*. **Ciência do Meio Ambiente Total** v.407, p 1923-1928, 2009.

Møller, P., et al., Inter-laboratory variation in measurement of DNA damage by the alkaline comet assay in the hCOMET ring trial, **Mutagenesis**, Volume 38, Issue 5, September 2023, Pages 283–294, <https://doi.org/10.1093/mutage/gead014>

MORAIS, V. H. T. et al. Use of *Biomphalaria glabrata* as a bioindicator of groundwater quality under the influence of NORM. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 242, p. 106791, 1 fev. 2022.

MORAIS, V. H. T. et al. Use of *Biomphalaria glabrata* as a bioindicator of groundwater quality under the influence of NORM. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 242, p. 106791, 1 fev. 2022.

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

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LENARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 13a. ed. Editora: Athene. 2016. 616 p.

PEQUENO, L. et al. O paradoxo da *Escherichia coli* como bioindicador. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 9, n. 2, p. 114–121, 23 maio 2024.

PEREIRA, D. R. et al. Utilização de ensaio cometa para detectar efeito genotóxico do mms em células de *Biomphalaria glabrata*. **Blucher Biophysics Proceedings**, p. 47–49, jan. 2018.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11a ed. Rio de Janeiro.

PILA, E. A.; SULLIVAN, J. T.; WU, X. Z.; FANG, J.; RUDKO, S. P.; GORDY, M. A.; HANINGTON, P. C. Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 119-128, 2016.

RESTES, R. M; VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v.

2, n. 4, p. 1473-1493, jul./set. 2019.

REY, Luís. **Bases da parasitologia médica**. 3a ed. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2015. 404 p.

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. **A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil**. In: POMPÊO, M. *et al.* (Org.). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - USP, 2015. Cap. 22: Ecotoxicologia. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap._22_Ecotoxicologia.pdf. Acesso em: 15 fev. 2025.

SILVA, P. B. *et al.* **Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco**. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 901-906, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000500003>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SILVA, P. S. Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio criciúma (sc) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia* sp., *Daphnia magna* e *Allium* cepa. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas UNESC, 2008.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988

SIQUEIRA, W. N. *et al.* Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 48, p. 69343–69353, 22 jul. 2021.

SIQUEIRA, W. N. *et al.* Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and**

SIQUEIRA, W. N.; FRANÇA, E. J.; PEREIRA, D. R.; LIMA, M. V., SILVA, H. A. M. F., ARAÚJO, H. D. A.; SÁ, J. L. F.; MELO, A. M. M.A. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, v. 249, p. 126218, 2020.

SIQUEIRA, W. N.; FRANÇA, E. J.; PEREIRA, D. R.; LIMA, M. V.; SILVA, H. A. M. F.; SÁ, J. L. F.; ARAÚJO, H. D. A.; MELO, A. M. M. A. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2021.

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

TALLARICO, L. DE F. *et al.* Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208–215, 1 dez. 2014.

TIRMARCHE, M. *et al.* ICRP Publication 150: Cancer Risks from Plutonium and Uranium Exposure. **Annals of the ICRP**, v. 50, n. 4, p. 1–143, dez. 2021.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A.P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, p. 76-86, 2007.

WACZUK E. P. et al. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 739–748, 1 jan. 2015.

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

YAO, J. et al. Effects of waterborne exposure to cadmium on biochemical responses in the freshwater gastropod, *Bellamya aeruginosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, p. 110365–110365, 27 fev. 2020.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464 p., 2006.