

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan**  
**Programa de Pós-graduação *Lato Sensu***  
**Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e**  
**Biofármacos**

**Jessica Brunhara Cruz**

**Análise comparativa de ecotoxicidade aguda em *Biomphalaria glabrata* e**  
***Lymnaea stagnalis* (mollusca: gastropoda) expostas ao cloreto de cádmio**

**São Paulo**

**2024**

**Jessica Brunhara Cruz**

**Análise comparativa de ecotoxicidade aguda em *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis* (mollusca: gastropoda) expostas ao cloreto de cádmio**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientadora: Dra. Lenita de Freitas Tallarico

**São Paulo**

**2024**

**Catálogo na Publicação  
Instituto Butantan  
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Cruz, Jessica Brunhara

Análise comparativa de ecotoxicidade aguda em *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis* (mollusca: gastropoda) expostas ao cloreto de cádmio / Jessica Brunhara Cruz ; orientador(a) Lenita de Freitas Tallarico - São Paulo, 2024.

51 p.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Ecotoxicologia 2. Padronização. 3. Gastrópodes. 4. Espécies nativas I. Tallarico, Lenita de Freitas . II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

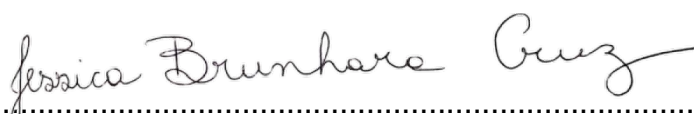
## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Jessica Brunhara Cruz, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 15 de janeiro de 2024.



.....  
Aluna: Jessica Brunhara Cruz



De acordo: .....

Orientadora: Dra. Lenita de Freitas Tallarico

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Edna e Alessandro, e ao meu namorado, Bruno, pelo apoio e incentivo desde o ingresso ao programa e durante toda a Especialização.

Aos meus amigos, em especial a Alessa, por tornar meus dias mais resilientes.

À minha orientadora, Dra. Lenita de Freitas Tallarico, pelos ensinamentos, apoio e confiança.

À toda equipe do laboratório de Malacologia que contribui para meu conhecimento.

À Coordenadora do curso de Especialização em Biotecnologia, Dra. Maria da Graça Salomão, por toda dedicação dispensada aos alunos.

Aos professores pelos ensinamentos.

"Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza".

(Marie Curie)

## RESUMO

CRUZ, Jessica Brunhara. **Análise comparativa de ecotoxicidade aguda em *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda) expostas ao cloreto de cádmio.** 2024. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

O cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) é um sal que apresenta alta solubilidade em água e frequentemente utilizado como substância de referência em avaliações ecotoxicológicas laboratoriais. Diversas instituições têm padronizado testes para definir limiares de periculosidade de produtos químicos, bem como a qualidade da água e dos efluentes, que visam proteger os organismos e os ecossistemas. Invertebrados são frequentemente utilizados nessas avaliações, sendo que os moluscos por serem o segundo maior grupo animal são sugeridos como modelos responsivos para diferentes abordagens. O incentivo ao uso de espécies nativas, é devido ao fato de que na maioria dos casos, são organismos mais sensíveis aos poluentes ambientais do que espécies invasoras, desse modo, validar testes com representatividade ecológica e ambiental em diferentes países é essencial. O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a sensibilidade do caramujo de água doce nativo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) com a espécie holártica normatizada na Europa para ensaios ecotoxicológicos, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), por meio da análise do efeito tóxico agudo da substância de referência  $\text{CdCl}_2$ . Para isso, foram avaliadas a sobrevivência de caramujos adultos das espécies *B. glabrata* e *L. stagnalis* através de exposições por 24 horas às concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ . A concentração letal média ( $\text{CL}_{50}$ ) para os organismos adultos foi de 0,48  $\text{mg L}^{-1}$  em *B. glabrata* e 0,33  $\text{mg L}^{-1}$  em *L. stagnalis*. Com os ensaios ecotoxicológicos realizados foi possível estabelecer parâmetros físico-químicos e avaliar comparativamente a sensibilidade da espécie *L. stagnalis* com a espécie *B. glabrata* e demonstrar que a *B. glabrata* se mostrou responsiva e com resultados similares aos observados com *L. stagnalis*. Para os procedimentos de padronização e normatização em países que necessitam de regulamentação de novos ensaios, a comparação entre organismos já validados mundialmente, corroboram com informações para a implementação de ensaios com espécies endêmicas em países como o Brasil.

**Palavras-chave:** Substância de referência. Padronização. Gastrópodes. Ecotoxicologia. Espécies nativas.

## ABSTRACT

CRUZ, Jessica Brunhara. **Comparative analysis of acute ecotoxicity in *Biomphalaria glabrata* and *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda) exposed to cadmium chloride**. 2024. 51 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) is a salt that has high solubility in water and is frequently adopted as a reference substance in laboratory ecotoxicological assays. Several institutions have been standardizing tests to define toxicity thresholds to protect organisms and ecosystems. Invertebrates are frequently used in these evaluations, and mollusks, the second largest animal group, are suggested as appropriate models. Standardizing ecotoxicological assays with native species is necessary, since in the majority of cases, they are more susceptible to environmental contamination than exotic species, and thus, validating tests with ecological and environmental representativeness in different countries is essential. The objective of this study was to compare and evaluate the sensitivity of the Brazilian native freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and the European standard species *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), by analyzing the acute toxic effect of  $\text{CdCl}_2$ . The survival of adult's snails of the species *B. glabrata* and *L. stagnalis* was evaluated through 24-hour exposure to concentrations of 0.00; 0.12; 0.25; 0.50; 1.00 and 2.00  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{CdCl}_2$ . The lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) for adult organisms was 0.48  $\text{mg L}^{-1}$  for *B. glabrata* and 0.33  $\text{mg L}^{-1}$  for *L. stagnalis*. With the ecotoxicological assays carried out, it was possible to establish physical-chemical parameters and comparatively evaluate the sensitivity of *L. stagnalis* and *B. glabrata*, it was possible to show that *B. glabrata* was responsive and had similar results to *L. stagnalis*. For standardization procedures in countries that require the regulation of new tests, the comparison between organisms already validated worldwide is an additional motivation to employ them for the implementation of tests with endemic species in countries such as Brazil.

**Keywords:** Reference substance. Standardization. Gastropods. Ecotoxicology. Native species.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Moluscos medidos com o auxílio de paquímetro. A) Espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> . B) Espécie <i>Lymnaea stagnalis</i> . .....	28
Figura 2 – Exposição de caramujos adultos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L <sup>-1</sup> de cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) para o ensaio de toxicidade aguda. ....	29
Figura 3 – Exposição de caramujos adultos da espécie <i>Lymnaea stagnalis</i> nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L <sup>-1</sup> de cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) para o ensaio de toxicidade aguda. ....	30
Figura 4 - Aspectos fisiológicos e visuais observados para determinar a mortalidade dos caramujos. A) Liberação de hemolinfa pelos caramujos adultos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> . B) Abertura da concha voltada para cima dos caramujos adultos da espécie <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	30
Figura 5 - Comparação da mortalidade entre as espécies <i>Biomphalaria glabrata</i> e <i>Lymnaea stagnalis</i> , expressa em porcentagem, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ). Grupo controle (0) exposto em água reconstituída.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ecotoxicidade aguda ao cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) em caramujos adultos das espécies <i>Biomphalaria glabrata</i> e <i>Lymnaea stagnalis</i> (n=30) expostos por 24 horas. ....	32
Tabela 2 - Relação de estudos sobre a toxicidade ao cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) em variadas espécies do Filo Mollusca. ....	39
Tabela 3 - Relação de estudos sobre a toxicidade ao cloreto de cádmio (CdCl <sub>2</sub> ) em variadas espécies do Filo Chordata. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
CdCl <sub>2</sub>	Cloreto de cádmio
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média
cm	Centímetros
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ISO	International Organization for Standardization
ml	Mililitros
mm	Milímetros
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
USEPA	United State Environmental Protection Agency

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Poluição ambiental e metais pesados .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Ensaio ecotoxicológico .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Os moluscos .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Classe Gastropoda.....	18
1.3.2 Avaliação ambiental com a espécie <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	19
1.3.3 Avaliação ambiental com a espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Cultivo e manutenção das espécies <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) e <i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758) .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Ensaio de ecotoxicidade aguda com adultos de moluscos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Análise estatística .....</b>	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Poluição ambiental e metais pesados

Os mesmos avanços tecnológicos que permitiram a expansão e o crescimento da humanidade, também são responsáveis por um dos principais problemas a serem enfrentados no século XXI: a poluição e suas consequências. Desde a revolução industrial, a crescente utilização de combustíveis fósseis e a exploração de recursos naturais são responsáveis pelo aumento da deposição de diversos poluentes em ecossistemas naturais (Heim; Schwarzbauer, 2013).

Os metais, detergentes sintéticos, derivados de nitrogênio e agroquímicos são substâncias que normalmente são liberadas, de maneira involuntária ou voluntariamente, nos corpos hídricos. Esses compostos influenciam todo ecossistema, pois podem promover alterações capazes de interferir nos processos fisiológicos e metabólicos dos organismos aquáticos, à cadeia alimentar e à saúde humana (Rand; Wells; Mccarty, 1995; Nikinmaa, 2014).

Esses agentes tóxicos representam grande ameaça para todo ecossistema, pois podem promover alterações capazes de interferir nos processos fisiológicos e metabólicos dos organismos aquáticos, à cadeia alimentar e à saúde humana (Rand; Wells; Mccarty, 1995; Nikinmaa, 2014).

Dentre as substâncias presentes no meio ambiente, os metais apresentam características singulares, pois ocorrem naturalmente e já são onipresentes em algum nível no ambiente (Peruzzo, 2018). De acordo com Zamora-Ledezma *et al.* (2021) metais pesados se classificam como substâncias metálicas que possuem mais de 4 g/cm<sup>3</sup> de densidade atômica e inclui nessa categoria elementos como cobre, chumbo, mercúrio e cádmio. Essas substâncias têm difícil degradação natural, o que favorece a sua deposição nos ecossistemas a longo prazo, por vezes séculos, facilitando assim a exposição de seres vivos a esses contaminantes (Azimi *et al.* 2017; Heim; Schwarzbauer, 2013).

As principais fontes antropogênicas de contaminação por metais pesados são a mineração, a agricultura e a geração de energia a partir de combustíveis fósseis (Zamora-Ledezma *et al.*, 2021). Independentemente da segurança com que os metais são utilizados, é inevitável algum nível de exposição humana e ambiental, tanto pelas

características químicas dos contaminantes quanto pelo uso dessas substâncias próximas a corpos d'água (Peruzzo, 2018).

Como substâncias persistentes e não biodegradáveis, na cadeia alimentar, os organismos menores contaminados são consumidos por predadores, que passam a acumular cada vez mais esses metais até eventualmente atingirem o ápice da cadeia alimentar, muitas vezes ocupado pelos próprios seres humanos (Arunakumara; Zhang, 2008; Hao *et al.*, 2019). Esse processo é denominado bioacumulação e é um dos responsáveis por cerca de 24% de todas as mortes anuais relacionadas a fatores ambientais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2016).

No grupo dos metais pesados, o cádmio é um dos mais relevantes nas avaliações ambientais, considerado potencialmente tóxico e representa risco contínuo para a saúde humana, principalmente quando introduzido na cadeia alimentar (Souid *et al.*, 2013; WHO, 1992). Sua aplicação está na confecção de baterias de níquel-cádmio, pilhas, pigmento para tintas e plásticos, fertilizantes fosfatados e pesticidas (Liu; Goyer; Waalkes, 2008). O cádmio apresenta características estáveis, alta toxicidade e é utilizado como referência no monitoramento ambiental.

## **1.2 Ensaios ecotoxicológicos**

A ecotoxicologia tornou-se instrumento fundamental de monitoramento ambiental para relacionar os poluentes químicos, o ambiente receptor e os organismos que habitam esses locais. Portanto, é uma ciência que permite avaliar e mensurar o risco ambiental proporcionado por diversos contaminantes de modo a atenuar possíveis impactos (Silva; Pompêo; Paiva, 2015). Devido à complexidade dos ecossistemas aquáticos, a ecotoxicologia aquática é fundamental para avaliar o impacto aos rios, lagos, mares e oceanos (Costa *et al.*, 2008).

Os testes ecotoxicológicos são realizados utilizando espécimes indicadores, uma vez que apenas a avaliação química dos corpos hídricos não retrata a consequência dos poluentes aos ecossistemas. Os contaminantes avaliados nos testes podem resultar em alterações na fisiologia, morfologia, comportamento e até mesmo levar a morte dos animais indicadores (Magalhães; Ferrão-Filho, 2008).

Para avaliar e antecipar efeitos nocivos, um dos objetivos e desafios dos estudos ecotoxicológicos é investigar como os poluentes podem afetar os organismos e os ecossistemas como um todo e identificar sinais precoces de poluição, definir

concentrações de compostos ambientalmente seguros e deter a degradação ambiental (Hellou, 2010). Dessa forma, diversas instituições internacionais, como United States Environmental Protection Agency (USEPA), Environment Canada, American Society for Testing and Materials (ASTM), Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) e International Organization for Standardization (ISO), têm padronizado ensaios para definir limiares de efeitos que visam proteger os organismos e os ecossistemas.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é a agência nacional responsável pela normatização de ensaios ambientais. No Brasil, uma das empresas pioneiras na padronização de ensaios é a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (ELHE, 2017). Somente em 2005, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) mediante a elaboração da Resolução 357 tornou como obrigatória a necessidade da realização de ensaios ecotoxicológicos padronizados, realizados com organismos aquáticos, mas somente na avaliação de efluentes (CONAMA, 2005; CONAMA 2011).

Os testes ecotoxicológicos classificam-se de acordo com o tempo de exposição dos bioindicadores ao contaminante analisado, possibilitando a análise de diferentes efeitos, como por exemplo, os efeitos agudos ou crônicos. Os efeitos agudos ocorrem rapidamente após a exposição ao agente estressor, podendo ser em horas ou dias e são, em sua maioria, efeitos mais severos. Em organismos aquáticos, os principais efeitos agudos avaliados são a letalidade e imobilidade. Os testes de ecotoxicidade aguda permitem calcular diversos parâmetros, como exemplo a Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>) e a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>), ou seja, a concentração de substância que causa efeito agudo e mortalidade, respectivamente, a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste (Costa, 2008; Tallarico, 2009).

Por outro lado, os efeitos crônicos ou sub-crônicos são observados após um período de exposição prolongado ou repetidas exposições, normalmente em concentrações menores, podendo compreender parte ou todo ciclo de vida do bioindicador, resultando em efeitos mais sutis como alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas, histológicas e reprodutivas (Costa, 2008; Tallarico, 2009).

Diversos organismos são utilizados em análises ecotoxicológicas em água doce, como algas verdes *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata*; microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia similis*,

*Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca* e peixes *Pimephales promelas*, *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* (Costa, 2008; Domingues; Bertoletti, 2008; Nikinmaa, 2014). De maneira geral, são utilizadas espécies modelos que são bem caracterizadas, são representativas de seu nível trófico, apresentam ampla distribuição geográfica, são fáceis de cultivar, reproduzir e adaptar em condições de laboratório e passíveis de manipulação experimental (Nikinmaa, 2014).

Os ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica utilizam substâncias de referência para garantir a qualidade analítica dos testes. Os ensaios com substâncias de referência são implementados para observar os ambientes em que os bioindicadores apresentam sensibilidade e para padronizar as condições fundamentais de teste para a espécie analisada. Uma vez definidos os parâmetros de ensaios, é plausível alcançar resultados com repetibilidade, ou seja, os resultados devem demonstrar precisão analítica no laboratório, e reprodutibilidade, ou seja, avaliar a precisão e exatidão dos resultados através de uma metodologia (Zagatto, 2006).

As substâncias de referências apresentam algumas características desejáveis: ser solúvel em água, ser um contaminante ambiental, estabilidade em água, alta toxicidade, ser fácil de analisar quimicamente e estar disponível no mercado. Podemos citar como exemplo a cloracetamida, o cloreto de cádmio, o fenol, o nitrato de prata, o sulfato de cobre e o sulfato de zinco (Zagatto, 2006).

Dentre as substâncias de referência, o cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) é amplamente utilizado devido sua solubilidade em água e ser um metal estável. Segundo a OECD (2016a), o  $\text{CdCl}_2$  é o composto utilizado nos estudos internacionais de validação para as Diretrizes de Testes com o gastrópode límnico *Lymanea stagnalis*, assegurando a sensibilidade dos organismos e a reprodutibilidade das condições de testes experimentais.

### 1.3 Os moluscos

O Filo Mollusca é composto por organismos diversos, que preenchem diferentes nichos ecológicos e possuem grande relação com a humanidade. Dentro do filo, quase 300 mil espécies já foram nomeadas pela comunidade científica, sendo dessas 52 mil espécies extintas e ainda 35 mil espécies encontradas apenas em fósseis. A magnitude desses números faz com os moluscos sejam, em número de espécies, o segundo maior filo do reino Animalia, suplantado apenas pelo filo



Arthropoda (Ponder; Lindberg; Ponder, 2020). Os moluscos são divididos em 8 grandes classes, sendo as que merecem destaque: a Gastropoda, classe dos caramujos, que compõem 75% do total de espécies; Bivalvia, classe das ostras e mariscos e Cephalopoda, classe dos polvos e lulas (Oehlmann; Schulte-oehlmann, 2003; Thiengo; Fernandez, 2008).

Os moluscos são fonte de diversos estudos visando o benefício humano. Devido à grande diversidade de espécies existe potencial no estudo de metabólitos produzidos pelos organismos deste grupo (Summer *et al.*, 2020). Pesquisas sobre o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias, antibióticos e antivirais utilizando subprodutos purificados desses animais são descritas na literatura (Benkendorff, 2010).

Além disso, os moluscos são amplamente aplicados como bioindicadores na monitoração e avaliação de diversos poluentes (López-Barea; Pueyo, 1998; Quinn *et al.*, 2004; Tallarico, 2015; Delfina *et al.*, 2016; Habib *et al.*, 2016; Al-Fanharawi; Rabee; Al-Mamoori, 2018; Campoy-Diaz *et al.*, 2018; de-Carvalho *et al.*, 2022). A seleção por esses organismos é realizada por diversos fatores relevantes, como possuir capacidade de acumular xenobióticos em seus tecidos, serem amplamente distribuídos geograficamente, de fácil amostragem, apresentam ciclo de vida curto e possuem tolerância a vários compostos químicos (como por exemplo, metais e contaminantes orgânicos) (Parmar; Rawtani; Agrawal, 2016; Baroudi *et al.*, 2020).

Os moluscos, principalmente no ambiente marinho, são muito estudados na avaliação de contaminações por metais. De acordo com Whyte *et al.* (2009), a bioacumulação de metais oriundos de águas contaminadas foi descrita primeiramente nos bivalves filtradores e foi observado diversos distúrbios no organismo desses animais.

Segundo o relatório de Segurança Química, o cádmio pode ser bioacumulado nas partes moles dos moluscos marinhos em elevadas concentrações. Nos aparelhos renais podem ser encontradas concentrações de 425 até 547 mg/kg, no fígado até 782 mg/kg e no hepatopâncreas até 1163 mg/kg de peso seco. Em moluscos de água doce podem ser encontradas concentrações nas partes moles entre 0,2 e 1,4 mg/kg de peso seco (WHO, 1992).

### 1.3.1 Classe Gastropoda

A classe Gastropoda constitui o grupo mais diversificado do filo Mollusca, compreendendo mais de 80% dos moluscos vivos. Os gastrópodes apresentam dentes quitinosos, a rádula; sistema circulatório aberto; tubo digestivo completo; respiração branquial, pulmonar ou tegumentar; manto responsável pela formação da concha; sistema nervoso ganglionar e torção da massa visceral durante o desenvolvimento embrionário. A massa cefalopodal é a região que se expande para fora da concha compreendendo a expansão muscular da superfície ventral unida a cabeça. O músculo columelar realiza a união do corpo do animal a concha, que pode ser univalva ou espiralada. Seus habitats são marinhos, límnicos e terrestres (Thiengo; Fernandez, 2008).

Além do potencial para a indústria farmacêutica e como organismos importantes para o biomonitoramento, a classe Gastropoda tem importância médica e econômica, sendo que diferentes espécies de caramujos dessa classe são hospedeiros intermediários de doenças, como a esquistossomose. No Brasil, até 2018, a esquistossomose causou 0,38 mortes por 100 mil habitantes, mostrando-se como uma causa relevante de morte no país (Pinheiro *et al.*, 2020).

Dentre os gastrópodes de água doce, duas famílias apresentam significância médica, veterinária, econômica e ecológica: as famílias Lymnaeidae e Planorbidae. Na família Lymnaeidae, duas espécies estão presentes no Brasil e são responsáveis pela transmissão da fascíola hepática, doença que acomete principalmente ruminantes, as espécies *Lymnaea columella* (Say, 1817) e a *Lymnaea viatrix* (Orbigny, 1835). A espécie exógena *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), já foi relatada como hospedeiro intermediário da fascíola hepática (Kendall, 1949), apresenta elevado potencial para desenvolvimento de técnicas para análise de hemócitos em caracóis e anticorpos monoclonais (Amen *et al.*, 1992). A *L. stagnalis* possui importância ecológica na Europa Central na colonização de trematódeos (Soldánová; Kostadinova, 2011) e é um modelo representativo para validação de diretriz para ensaios de ecotoxicidade (Ducrot *et al.*, 2014).

A família Planorbidae, compreende os caramujos do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910). O gênero possui dez espécies nativas do Brasil, sendo três hospedeiras do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), trematódeos causadores da esquistossomose mansônica (Lanzer *et al.*, 2007). Além disso, diversos estudos

sugerem o emprego de bionfalárias como bioindicadores significativos na identificação de toxicidade e mutagenicidade aquática (Nakano; Tallarico, 2007). Particularmente, a espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) indicada desde 1987 por Münzinger como um modelo experimental para o monitoramento ambiental.

### 1.3.2 Avaliação ambiental com a espécie *Lymnaea stagnalis*

A espécie *Lymnaea stagnalis*, comumente conhecida como grande caracol de lagoa, é uma espécie abundante e difundida que coloniza sistemas límnicos temperados na Ásia (central, norte, sul e sudeste), América do Norte, Norte da África, Nova Zelândia e Europa (Fodor *et al.*, 2020). Os caracóis habitam águas rasas estagnadas e de fluxo lento, ocupam margens rasas e ricas em vegetação e são principalmente herbívoros, preferindo algas, plantas aquáticas e detritos (Lance *et al.*, 2006).

Eles são ativos durante o ano todo, mas normalmente se reproduzem da primavera ao final do outono. Apesar de serem hermafroditas, preferem fertilização cruzada, podendo desempenhar papéis femininos e masculinos no acasalamento. Esses organismos depositam massas de ovos contidas nas cápsulas em superfícies no ambiente, os embriões se desenvolvem no interior de ovos transparentes de formato oval e podem levar de 11 a 12 dias até a eclosão. Atingem a maturidade sexual entre dois a três meses, a depender das condições ambientais (Kuroda; Abe, 2020; Fodor *et al.*, 2020).

Os corpos dos caracóis são marrons claro a escuro-amarelados. As conchas dos adultos são de cor amarelo-marrom, enquanto os caracóis jovens apresentam conchas mais translúcidas. Os espécimes adultos apresentam de três a cinco centímetros de comprimento e de dois a três centímetros de largura da concha. Em seu habitat natural, podem atingir uma idade superior a um ano, mas em laboratório vivem por até dois anos (Kuroda; Abe, 2020; Fodor *et al.*, 2020).

Os primeiros estudos com a espécie datam do final da década de 1940, foram concentrados na histologia, na citologia, no desenvolvimento dos sistemas reprodutivo e neuronal, e na formação da concha. Entre 1970 a 2000, a maior parte dos trabalhos foram dedicados a estudos de neurociência. A partir dessa data, um grande número de investigações toxicológicas deu foco na sensibilidade e biocumulação da *L. stagnalis* aos metais e a outros elementos metálicos (Amorim *et al.*, 2019). Nos últimos

anos, diversos trabalhos abordam o risco ambiental de produtos químicos, como tributestanho e microplásticos utilizando este caramujo como modelo (Reátegui-Zirena; Salice, 2018; Horton *et al.*, 2020).

Em relação aos metais e aos ensaios ecotoxicológicos utilizando a espécie *L. stagnalis*, Gomot (1998) realizou exposições crônicas a diferentes concentrações de cádmio e avaliou a reprodução, desenvolvimento embrionário e eclosão dos ovos. O autor observou que o cádmio cessou a produção de ovos pelos adultos na maior concentração estudada, sendo o desenvolvimento embrionário a fase mais sensível ao metal e, com isso, concluiu a possibilidade de prever sobrevivência da espécie num ambiente poluído com cádmio.

Coeurdassier *et al.* (2004), avaliou os efeitos do cádmio na sobrevivência de três estádios de vida da *L. stagnalis*, dois grupos de caramujos jovens (quatro e nove semanas) e um grupo de adultos (20 semanas). Os autores avaliaram os animais por oito dias, a fim de entender como o tempo de exposição afetava a dose letal média para cada estágio de vida e qual estágio era mais sensível. Constatou-se que os espécimes jovens, em especial os caramujos de quatro semanas, eram mais sensíveis à contaminação por cádmio e sua dose letal média caía mais rapidamente com mais tempo de exposição.

Reátegui-Zirena *et al.* (2017) expuseram caramujos adultos a diferentes concentrações de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) e observaram efeitos nos adultos, em relação ao crescimento e reprodução, e efeitos transgeracionais nessa espécie.

A partir dos estudos de Ducrot *et al.* (2014), sete laboratórios realizaram testes com caramujos cultivados e expostos ao  $\text{CdCl}_2$  em diferentes concentrações. Os resultados foram reprodutíveis e foi definido o valor de toxicidade reprodutiva para ensaios crônicos com o caramujo, sendo um teste validado e implementado em laboratórios na Europa e que deu embasamento para a elaboração da norma de ensaio proposta pela OECD.

Notavelmente, *L. stagnalis* e *Potamopyrgus antipodarum* são os primeiros organismos modelos invertebrados de água doce não artrópodes a serem reconhecidos em avaliações de risco ambiental. Atualmente, as espécies são aceitas como organismos de teste padrão para estudos ecotoxicológicos. O teste de reprodução desenvolvido foi oficialmente aprovado pelos coordenadores da OECD e publicado as diretrizes de referência OECD, 2016a e OECD, 2016b.

### 1.3.3 Avaliação ambiental com a espécie *Biomphalaria glabrata*

A espécie *Biomphalaria glabrata* é amplamente estudada no Brasil devido sua participação no ciclo de transmissão da esquistossomose. Esses caramujos vivem preferencialmente em águas rasas e doces com água estagnada ou corrente lenta (Tuan, 2009). O substrato alimentar dependerá da disponibilidade do ambiente, como leito lodoso ou rochoso, vegetação enraizada e organismos em decomposição.

Em relação a reprodução, a espécie é hermafrodita e possui elevada atividade reprodutiva. A postura dos ovos ocorre ao longo de todo ano, usualmente noturna sobre a vegetação. Os ovos são ovipostos aglomerados e recobertos por uma cápsula protetora. O período embrionário é de seis a oito dias, com eclosão entre sete a dez dias, a depender da temperatura. A maturidade sexual é atingida após a quarta semana de vida (Kawano; Nakano; Watanabe, 2008).

A espécie é a maior em comprimento da família Planorbidae atingindo tamanho próximo de 4,7 cm de corpo distendido. A concha possui formato planispiral e, no indivíduo adulto, atinge diâmetro entre dois a quatro centímetros com cinco a oito milímetros de espessura e com seis a sete giros. A coloração varia de marrom a castanha clara, sendo influenciada pelas características químicas da água e da disponibilidade de cálcio, elemento necessário ao processo de biomineralização da concha (Silva *et al.*, 2006).

A *B. glabrata* tem sido empregada em diferentes estudos de toxicidade que serão abordados a seguir. Salice; Miller; Roesijadi (2008), observaram respostas demográficas à exposição de três gerações consecutivas ao cádmio, concluindo que o metal afetou significativamente o sucesso da eclosão, o tempo de maturidade reprodutiva e a sobrevivência de juvenis e adultos.

A eletroforese em gel unicelular ou ensaio cometa na espécie foi estabelecido pelo grupo de Grazeffe *et al.* (2008). O teste estabelecido consiste em avaliar danos no DNA utilizando a radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ . O ensaio cometa demonstrou ser uma boa ferramenta para detectar os danos no DNA e confiável na avaliação dos efeitos genotóxicos ambientais.

Ansaldo *et al.* (2009) avaliaram a exposição aguda de caramujos adultos ao efeito tóxico do cádmio, arsênio e chumbo e observaram alteração na reprodução, no desenvolvimento embrionário e sobrevivência dos embriões.

Tallarico et al. (2014) propuseram um protocolo combinando técnicas para avaliação da toxicidade para adultos e embriões e mutagenicidade com a *B. glabrata*. A toxicidade aguda foi avaliada utilizando a substância de referência dicromato de potássio. A ciclofosfamida foi o composto utilizado para avaliar a mutagenicidade. Na avaliação do modelo em estudos ambientais, utilizou-se amostras de água de uma estação de tratamento de águas residuais e comparou-se a sensibilidade dos gastrópodes com a espécie *Daphnia similis*, organismo teste recomendado em estudos ecotoxicológicos no Brasil. Os resultados demonstraram que o protocolo foi eficaz para a avaliação de poluentes aquáticos e foi possível observar uma sensibilidade qualitativamente semelhante com a *D. similis*, indicando que a *B. glabrata* é um modelo indicado para tais estudos.

De acordo com Martins; Biachini (2011), identificaram que espécies nativas são, na maioria dos casos, mais sensíveis aos poluentes ambientais do que espécies invasoras pertencentes ao mesmo grupo. Nesse sentido, a espécie *B. glabrata* foi descrita como uma candidata relevante para o desenvolvimento de protocolos para avaliar diferentes *endpoints* como para a classificação do nível de periculosidade e risco de substâncias químicas e o monitoramento da qualidade da água e efluentes por meio de avaliações em diferentes fases do ciclo de desenvolvimento dos caramujos, como por exemplo, a sobrevivência, taxa de eclosão embrionária, alterações no desenvolvimento, na fisiologia e comportamental (Tallarico, 2015; Caixeta *et al.*, 2022).

No Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, os caramujos reprodutores da espécie *B. glabrata* são mantidos há mais de 30 anos e são utilizados em diversos estudos. Tallarico; Miyasato; Nakano (2016) publicaram uma revisão sobre a criação e manutenção da espécie em condições de laboratório elencando os principais fatores que contribuem para o sucesso das pesquisas do laboratório. Assim como a espécie *L. stagnalis* também é mantida há mais de 10 anos em culturas no laboratório.

A utilização de gastrópodes de água doce como bioindicadores para avaliação de perigos e riscos ambientais de substâncias/produtos químicos é sugerida pela OECD e pela USEPA. No entanto, até o momento, existem apenas duas diretrizes disponíveis utilizando caramujos de água doce: Diretriz n°. 242 que recomenda a análise dos efeitos potenciais da exposição prolongada a produtos químicos na reprodução e sobrevivência do caracol de água doce *Potamopyrgus antipodarum*

(OECD, 2016b), e a Diretriz nº. 243 para avaliar a toxicidade reprodutiva do caracol hermafrodita de água doce *L. stagnalis* (OECD, 2016a). Desse modo, a utilização de uma espécie representativa de ecossistemas de regiões tropicais é uma ferramenta necessária para o monitoramento ambiental na América Latina e se faz necessário a padronização de novas diretrizes nacionais, destacando-se a espécie *B. glabrata* que já se vem demonstrando ser responsiva e eficiente para as mais diferentes avaliações ambientais.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a sensibilidade do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), endêmica no Brasil, com a espécie normatizada para ensaios ecotoxicológicos na Europa *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), por meio da análise do efeito tóxico agudo da substância de referência cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), para estabelecer parâmetros da espécie nativa que contribuirão para a normatização de ensaios de ecotoxicidade junto à Associação Brasileira de Normas Técnicas.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cultivo e manutenção das espécies *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758)

Os espécimes de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) são cultivados em laboratório por mais de três décadas e são descendentes da população de Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, Minas Gerais). Os espécimes de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) são cultivados em laboratório desde 2008 e são descendentes de uma população cultivada na Universidade Shinshu, Japão e naturais de uma população originária de Neustadt an der Donau, Alemanha.

As duas espécies de caramujos são mantidas em aquários plásticos (dimensões de 50 x 23 x 17 cm), com água filtrada, aeradores e temperatura ambiente de 25°C ( $\pm 2$ ). A alimentação é realizada com alface fresca *ad libitum* (três vezes por semana), ração de peixe flocada e carbonato de cálcio (uma vez por semana) e a troca de água é realizada com um mínimo de 15 dias.

#### 3.2 Ensaio de ecotoxicidade aguda com adultos de moluscos

Foram utilizados animais adultos com diâmetro de 10 a 13 mm de *B. glabrata*, e para a espécie *L. stagnalis*, espécimes adultos com comprimento de 18 a 20 mm, com concha intacta e idade mínima de dois meses para os ensaios preliminares e definitivos. A oxigenação foi garantida pela constante aeração da água. Foram medidos os parâmetros: pH, dureza, condutividade elétrica e temperatura da água.

Foram realizados dois ensaios preliminares com cada espécie, utilizados cinco caramujos por grupo. Para todos os ensaios foi utilizada água mole reconstituída para a diluição da substância de referência - cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ ) CAS 7790-78-5 (Sigma®).

As concentrações escolhidas para o primeiro ensaio preliminar, com exposição de 96 horas, foram 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> (fator de diluição 2x) de  $\text{CdCl}_2$ , e um controle negativo mantido nas mesmas condições do ensaio e contendo somente água reconstituída, representado pela concentração 0,00 mg L<sup>-1</sup>.

No segundo ensaio preliminar, foram realizadas exposições de cinco caramujos por grupo, em 24 horas, seguindo os mesmos padrões do teste anterior e

determinadas as concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub>. As observações foram realizadas até o quinto dia (120 horas). No grupo exposto com 2,00 mg L<sup>-1</sup> ocorreu 100% de mortalidade e no grupo exposto com 1,00 mg L<sup>-1</sup>, 40% de mortalidade na avaliação de 120 horas.

A partir dos ensaios preliminares, foram realizadas quatro repetições definitivas com as concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup>. Nas duas primeiras repetições (definido como Ensaio 1), cada concentração foi realizada com cinco animais. Os exemplares de *B. glabrata* foram colocados em copos de vidro contendo as soluções, com capacidade de 180 ml e seis cm de diâmetro. Os animais da espécie *L. stagnalis* foram colocados em béqueres de vidro contendo as soluções, com capacidade de 250 ml e sete cm de diâmetro. Ambos foram mantidos em temperatura ambiente de 25°C (±2) e fotoperíodo controlado (ciclo claro/escuro de 12 horas). Nas primeiras 24 horas, foram utilizadas tampas de placas de Petri de vidro e, após esse período, foi colocada uma tampa plástica transparente com pequenos orifícios para vedar o copo, possibilitar a troca de ar e para que o animal permanecesse em contato com a substância durante toda a exposição.

Nas duas repetições seguintes (Ensaio 2 e 3), foram expostos dez animais por concentração. Os espécimes de *B. glabrata* foram colocados em copos de vidro contendo as soluções, com capacidade de 180 ml e seis cm de diâmetro. Os animais da espécie *L. stagnalis* foram colocados em recipientes de plástico descartáveis contendo as soluções, com capacidade de 500 ml e 10 cm de diâmetro. A utilização de recipientes de plástico descartáveis foi selecionada com base em um ensaio preliminar e na quantidade de animais para a exposição, visto que foi a primeira vez que foram realizados ensaios com essa espécie em nosso laboratório.

Ambos foram mantidos em temperatura ambiente de 25°C (±2) e fotoperíodo controlado (ciclo claro/escuro de 12 horas). Foi colocada uma tampa plástica transparente com pequenos orifícios para vedar o copo, possibilitar a troca de ar e para que o animal permanecesse em contato com a substância durante toda a exposição.

Os ensaios foram realizados em sistema semi-estático, com duração de cinco dias (96 horas) e exposição dos animais por 24 horas. Os parâmetros de condutividade elétrica, dureza, pH e temperatura da água foram monitorados. Os caramujos foram alimentados com alface fresca após as 24 horas de exposição.

A variável observada nos ensaios foi a sobrevivência e observadas todas as alterações comportamentais dos animais. Para a comprovação da morte foi analisada a ausência de batimentos cardíacos durante dois minutos de observação ao microscópio estereoscópico. Outros critérios usados para auxiliar a verificação da morte dos caramujos foi a observação de liberação de hemolinfa para as bionfalárias, o aspecto pálido da concha, pequenos estímulos podais sem resposta e, em especial para *L. stagnalis*, o pé situa-se em protrusão anormal para fora da concha e enrijecido, e a abertura da concha voltada para cima (OECD, 2016a).

### **3.3 Análise estatística**

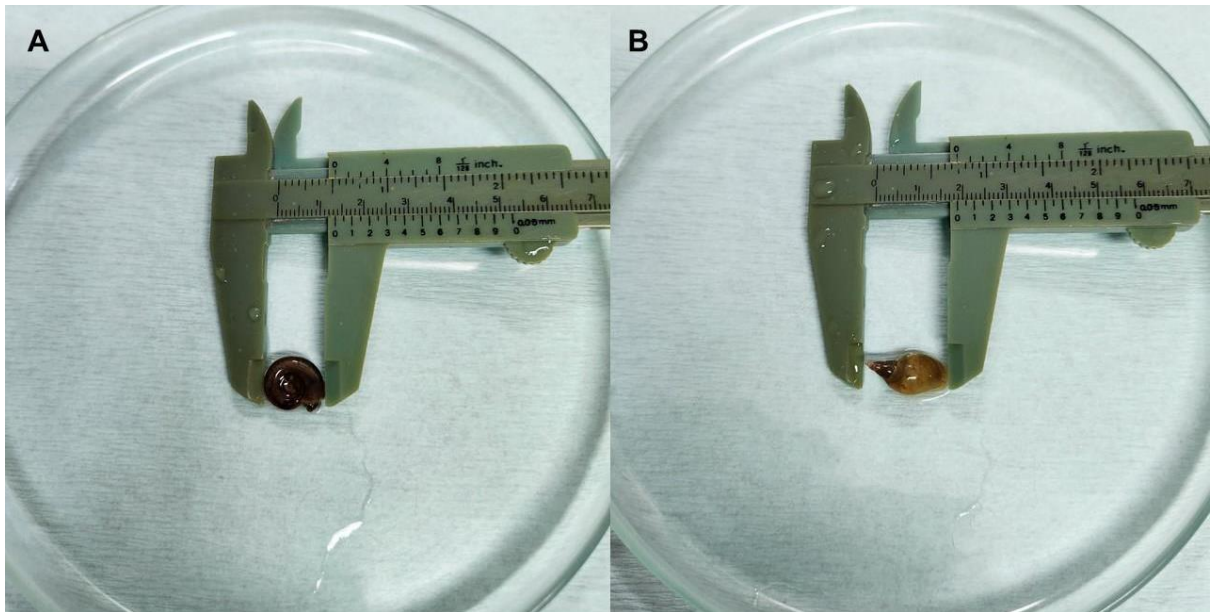
Para os ensaios de toxicidade aguda com  $\text{CdCl}_2$  em adultos de *B. glabrata* e *L. stagnalis* foi calculada a concentração letal mediana, que leva a mortalidade de 50% da população exposta de caramujos adultos ( $\text{CL}_{50}$ ), incluindo o intervalo de confiança de 95% que foi estimado pelo método de análise Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977).

## 4 RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos da água reconstituída analisados para o uso em todos os ensaios foram: pH, que permaneceu dentro da faixa de 7,00 e 8,50, não variando mais do que duas unidades; a condutividade elétrica, que variou entre 160 e 271  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; a dureza da água, que manteve-se em 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  e a temperatura que ficou entre 23 e 25°C.

Os caramujos selecionados foram medidos com o auxílio de paquímetro e apresentaram diâmetro entre 10 a 13 mm para a espécie *Biomphalaria glabrata* e comprimento entre 18 a 20 mm para a espécie *Lymnaea stagnalis*, com concha intacta e idade mínima de dois meses (Figura 1).

**Figura 1** - Moluscos medidos com o auxílio de paquímetro. A) Espécie *Biomphalaria glabrata*. B) Espécie *Lymnaea stagnalis*.



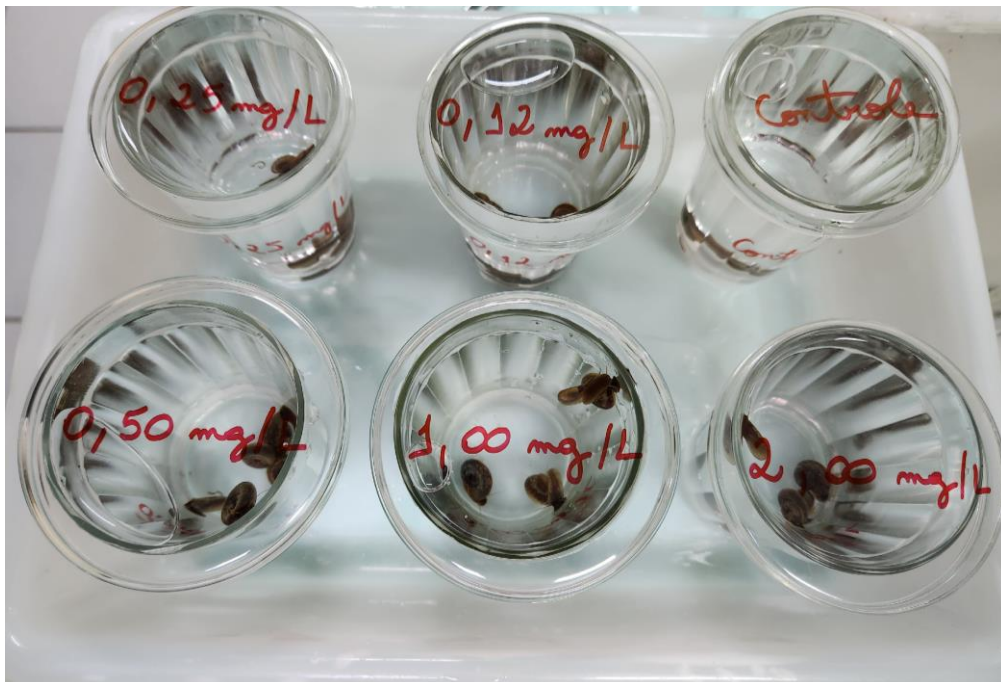
**Fonte:** próprio autor.

Os dois ensaios preliminares de toxicidade aguda com caramujos adultos de *B. glabrata* e *L. stagnalis* expostos ao cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) foram realizados, respectivamente, com 96 e 24 horas de exposição para o estabelecimento das concentrações utilizadas nos ensaios definitivos de ecotoxicidade aguda, que foram definidos com exposição de 24 horas.

A partir do primeiro ensaio para o estabelecimento da faixa de concentrações, foi realizado o segundo ensaio com as concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub>. A CL<sub>50</sub> encontrada foi de 1,07 mg L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança de 1,45 a 0,79 mg L<sup>-1</sup> para *B. glabrata* e 0,93 mg L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança de 1,38 a 0,63 mg L<sup>-1</sup> para *L. stagnalis*. A partir desses resultados foram definidas as concentrações dos ensaios definitivos de ecotoxicidade aguda com os organismos adultos das espécies *B. glabrata* e *L. stagnalis*.

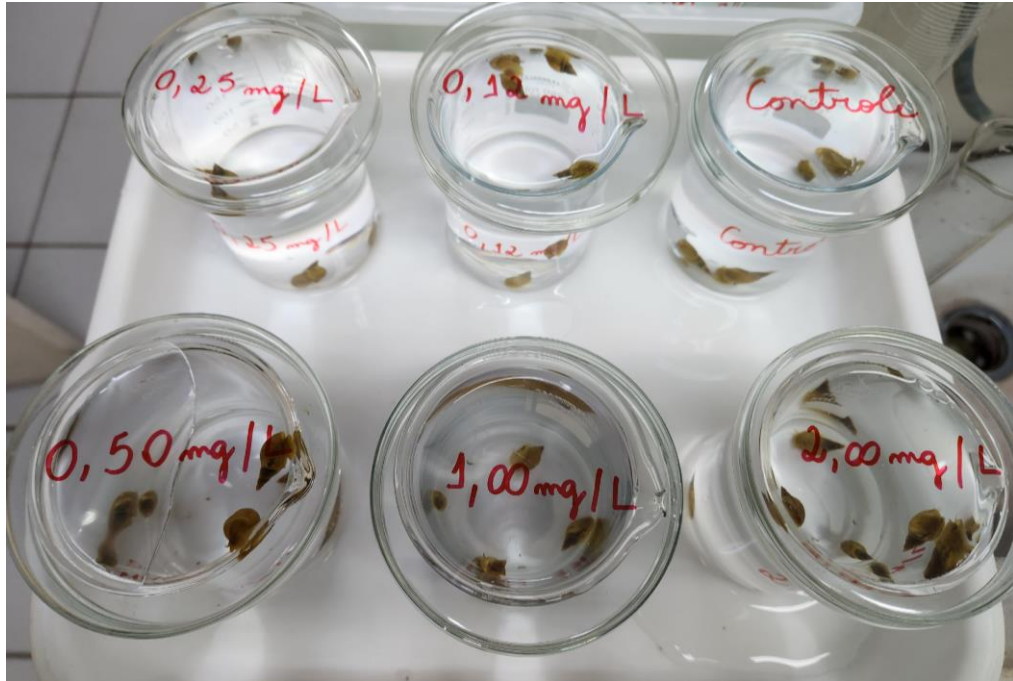
Posteriormente, foram realizados os ensaios de ecotoxicidade aguda para caramujos adultos de ambas as espécies, com as concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub> (Figura 2; Figura 3), expostos por 24 horas e duração de cinco dias de avaliação. A constatação da morte dos caramujos foi realizada com a observação de liberação de hemolinfa, o aspecto pálido da concha, pequenos estímulos podais sem respostas, pé em protrusão anormal para fora da concha e enrijecido, e a abertura da concha voltada para cima (Figura 4).

**Figura 2** – Exposição de caramujos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata* nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) para o ensaio de toxicidade aguda.



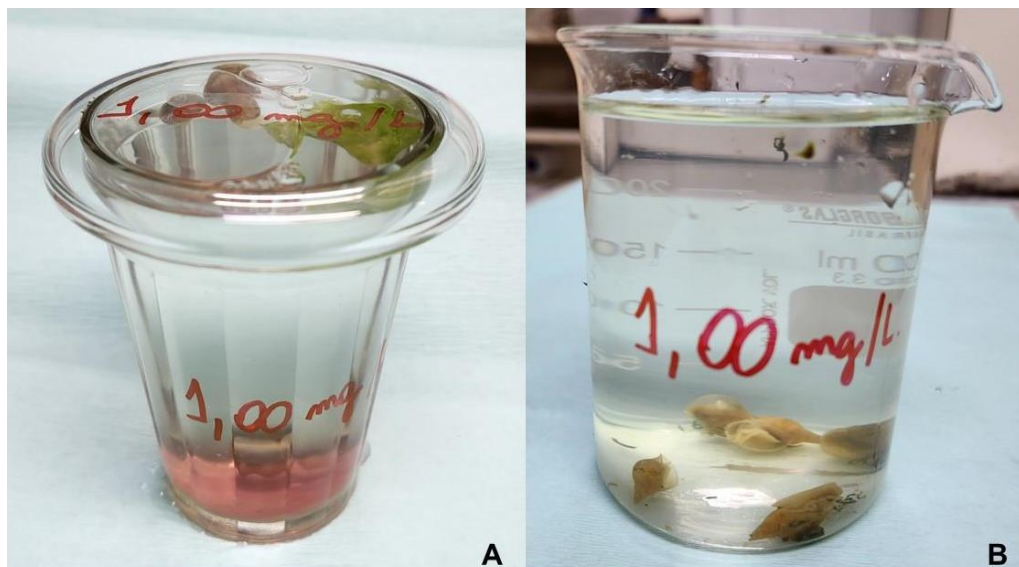
Fonte: próprio autor.

**Figura 3** – Exposição de caramujos adultos da espécie *Lymnaea stagnalis* nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) para o ensaio de toxicidade aguda.



Fonte: próprio autor.

**Figura 4** - Aspectos fisiológicos e visuais observados para determinar a mortalidade dos caramujos. A) Liberação de hemolinfa pelos caramujos adultos da espécie *Biomphalaria glabrata*. B) Abertura da concha voltada para cima dos caramujos adultos da espécie *Lymnaea stagnalis*.



Fonte: próprio autor.



O número de indivíduos por grupo dos dois primeiros ensaios foi somado para obtermos dez animais por repetição (Ensaio 1). A concentração letal média resultante dos ensaios foi similar para as duas espécies analisadas com  $CL_{50}$  de  $0,48 \text{ mg L}^{-1}$ , com intervalo de confiança de  $0,38$  a  $0,62 \text{ mg L}^{-1}$  para *B. glabrata* e  $0,33 \text{ mg L}^{-1}$ , com intervalo de confiança de  $0,26$  a  $0,43 \text{ mg L}^{-1}$  para *L. stagnalis* (Tabela 1). Observou-se 100% de mortalidade dos caramujos das espécies *B. glabrata* e *L. stagnalis* para as concentrações mais altas ( $1,00$  e  $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) de exposição ao  $\text{CdCl}_2$ . A concentração de  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ , apresentou alta mortalidade, sendo 43% para *B. glabrata* e 93% *L. stagnalis*. A concentração de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ , apresentou baixa mortalidade, sendo 17% para *B. glabrata* e 27% *L. stagnalis*. A concentração mais baixa,  $0,12 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ , apresentou esporádicas mortes, sendo 7% para *B. glabrata* e 10% *L. stagnalis*. No grupo controle negativo não houve mortalidade (Tabela 1).

Dessa maneira, observamos que quanto maior a concentração de exposição de  $\text{CdCl}_2$ , maior foi a porcentagem de mortalidade observada em ambas as espécies (Figura 5).

**Tabela 1** – Ecotoxicidade aguda ao cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em caramujos adultos das espécies *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis* (n=30) expostos por 24 horas.

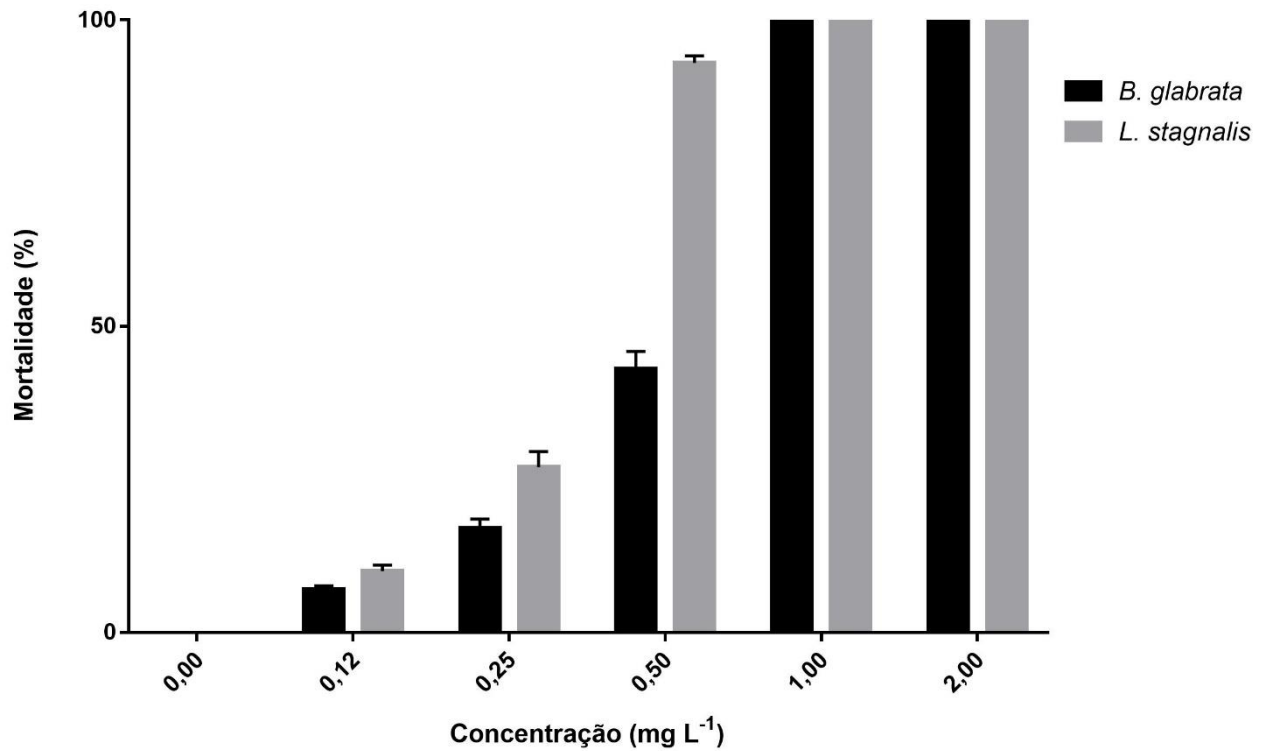
	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Mortalidade total	Mortalidade (%)	Média	$\pm$ DP	CL50 $\text{mg L}^{-1}$ (IC)
<b>B. glabrata</b>	0,00	0	0	0	0	0	0,00	0	
	0,12	1	1	0	2	7	0,67	0,58	
	0,25	3	0	2	5	17	1,67	1,53	
	0,50	6	1	6	13	43	4,33	2,89	0,48 (0,38 - 0,62)
	1,00	10	10	10	30	100	10,00	0	
	2,00	10	10	10	30	100	10,00	0	
<b>L. stagnalis</b>	0,00	0	0	0	0	0	0,00	0	
	0,12	0	1	2	3	10	1,00	1	
	0,25	3	0	5	8	27	2,67	2,52	
	0,50	10	8	10	28	93	9,33	1,15	0,33 (0,26 - 0,43)
	1,00	10	10	10	30	100	10,00	0	
	2,00	10	10	10	30	100	10,00	0	

0,0 = Controle Negativo (água reconstituída); DP = desvio padrão (s); IC= intervalo de confiança de 95%

Fonte: próprio autor.



**Figura 5** - Comparação da mortalidade entre as espécies *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis*, expressa em porcentagem, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ). Grupo controle (0) exposto em água reconstituída.



Fonte: próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, com os ensaios ecotoxicológicos agudos realizados com as espécies de gastrópodes de água doce, foi possível avaliar comparativamente a sensibilidade da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), endêmica no Brasil, com a espécie *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), organismo normatizado na Europa, a exposição a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ). Os nossos resultados permitiram estabelecer parâmetros que contribuirão para a padronização e normatização de ensaios de ecotoxicidade com a espécie nativa junto à ABNT.

Quanto aos parâmetros físicos e químicos medidos verificou-se que as faixas de valores obtidos para pH (7,00-8,50), condutividade ( $160\text{-}270 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), dureza da água ( $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) e a temperatura ( $23,0\text{-}25,4^\circ\text{C}$ ) mostraram ser indicados para os ensaios de toxicidade aguda com caramujos adultos de *B. glabrata* e foram adequados também para a espécie exótica *L. stagnalis* mantida no laboratório, que apresenta os seguintes parâmetros de ensaio segundo a OECD (2016a): pH entre 6,50-8,50, condutividade entre  $600 \pm 200 \mu\text{S cm}^{-1}$ , dureza da água de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  e temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ao comparar alguns parâmetros físico-químicos preconizados nos ensaios padronizados com os moluscos de água doce *L. stagnalis*, somente o pH apresenta valor próximo do encontrado com *B. glabrata*. Isso pode ser observado devido ao fato de os ensaios serem conduzidos em clima temperado, como encontrado na Europa, possibilitando adaptações diferentes das espécies as condições tropicais do Brasil.

As recomendações para a cultura e experimentação da espécie *L. stagnalis* seguiu as diretrizes da OECD (2016a). Dentre os laboratórios responsáveis pela realização e padronização da normativa dos testes com a *L. stagnalis*, o resultado encontrado de  $\text{CL}_{50}$  foi próximo encontrada a um dos laboratórios envolvidos, com o valor de  $0,199 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$  (Ducrot et al., 2014). Ao comparar as recomendações com o ensaio utilizando a espécie *B. glabrata*, obteve-se sucesso em relação aos experimentos e os valores de  $\text{CL}_{50}$  observados neste trabalho se aproximam da espécie padronizada. As possíveis diferenças observadas entre os intervalos de confiança, podem estar relacionados ao tempo de exposição e observação, uma vez que a diretriz da OECD (2016a) descreve um teste de crônico de análise reprodutiva

e com período de exposição prolongado de 28 dias com concentrações de CdCl<sub>2</sub> inferiores as utilizadas em nosso estudo.

Os valores de CL<sub>50</sub> encontrados para a espécie *B. glabrata* são similares aos encontrados por Cantinha *et al.* (2017). Eles expuseram a espécie a um desafio similar ao adotado no presente trabalho, utilizando concentrações de CdCl<sub>2</sub> menores, (0,15; 0,22; 0,33; 0,5 e 0,7 mg L<sup>-1</sup>), mas com exposição dos caramujos por um período de tempo maior (96 horas) que o utilizado em nosso trabalho (24h). As diferenças na condução do teste podem ter resultado em CL<sub>50</sub> diferentes, no entanto, o intervalo de confiança obtido neste trabalho se assemelha aos resultados encontrados pelo grupo.

Habib *et al.* (2016) expôs caramujos adultos da espécie *Biomphalaria alexandrina* ao CdCl<sub>2</sub> e obteve CL<sub>50</sub> igual a 0,219 mg L<sup>-1</sup> para exposição por 96 horas. Os resultados são próximos aos observados em nossos testes, mas essa diferença pode ser esperada por se tratar de uma espécie diferente sendo a *B. alexandrina*, endêmica nos ecossistemas egípcios. Outra observação importante feita foi em relação ao comportamento dos animais, houveram alterações nos comportamentos de fixação, locomoção e alimentação dos caramujos, o que prejudicaria a sobrevivência desses animais na natureza. Dessa forma, concluíram que o comportamento é um parâmetro mais sensível comparado a sobrevivência para efeitos de toxicidade ambiental.

Nos ensaios ecotoxicológicos realizados, foi perceptível as mudanças no comportamento dos animais nas diferentes concentrações de CdCl<sub>2</sub>, mesmo sem ocasionar mortalidade. Os animais se apresentaram mais prostrados nas concentrações mais elevadas e não houve consumo de alface após a exposição até as 96 horas de avaliação. As alterações no comportamento relacionam-se a complexidade de efeitos causados pelo contaminante no organismo, uma vez que essas substâncias atuam como químicos desreguladores endócrinos e influenciam os processos fisiológicos, reprodutivos e endócrinos (Czech; Weber; Dietrich, 2001; Zala; Penn, 2004; Rittschof; McClellan-Green, 2005; Lagadic; Coutellec; Caquet, 2007).

Das; Khangarot (2010) avaliaram a espécie *Lymnaea luteola* e obtiveram CL<sub>50</sub> em sete dias de 0,496 mg L<sup>-1</sup> e em 49 dias de 0,043 mg L<sup>-1</sup>. A exposição ao cádmio inibiu significativamente as taxas de alimentação e crescimento, e o tempo de exposição influenciou a sensibilidade dos animais observando redução no valor da CL<sub>50</sub>, logo demonstrando maior sensibilidade.

Dhara; Saha; Maiti, (2017) avaliaram a espécie *Lymnaea acuminata* e obtiveram CL<sub>50</sub> em 24 horas de 9,660 mg L<sup>-1</sup> e em 96 horas de 5,54 mg L<sup>-1</sup>, inferindo que a espécie apresenta baixa sensibilidade ao CdCl<sub>2</sub>. Um dos parâmetros físico-químicos que pode influenciar esse valor é a dureza da água, pois a dureza da água influencia na sensibilidade dos animais a metais pesados. A metodologia de Dhara; Saha; Maiti (2017) apresentava dureza de 120 mg L<sup>-1</sup> podendo influenciar a CL<sub>50</sub> como evidenciado por Datta; Masala; Das (2003). As águas mais duras aumentam a resistência aos contaminantes e conseqüentemente são observadas maiores CL<sub>50</sub> quando os testes ocorrem nesse meio (Pascoe; Evans; Woodworth, 1986).

A USEPA (2016) elencou diversos trabalhos demonstrando que a toxicidade aguda do cádmio diminui com o aumento da dureza da água na maioria dos animais de água doce testados. Os ensaios de ecotoxicidade agudos conduzidos com *Daphnia magna* em três níveis diferentes de dureza da água demonstram que os dafnídeos são pelo menos cinco vezes mais sensíveis ao cádmio em água mole do que em água dura. A redução a toxicidade do cádmio também foi observada em *D. pulex*, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e truta (*Salvelinus fontinalis*).

Ao observar diferentes moluscos, a CL<sub>50</sub> de exposição ao cloreto de cádmio pode variar drasticamente ao se comparar espécies de hábitos diferentes e submetidos a condições de testes ecotoxicológicos diferentes. Ruppert *et al.* (2016), utilizou o gastrópode *Potamopyrgus antipodarum* em dois estágios de vida, juvenis e adultos, obtendo CL<sub>50</sub> igual a 0,038 mg L<sup>-1</sup> e 0,015 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. De Silva *et al.* (2023), utilizou o caramujo estuarino *Amphibola crenata* e obteve CL<sub>50</sub> igual a 50,40 mg L<sup>-1</sup>, valor mais alto encontrado em moluscos, superando a maioria dos valores observados em diversas espécies do filo Chordata.

Uma das espécies comumente mais utilizadas dentre os cordados é o peixe *Danio rerio*, animal pertencente a classe Actinopterygii. Hu *et al.* (2022), ao utilizar o estágio de vida larval obtiveram CL<sub>50</sub> igual a 6,84 mg L<sup>-1</sup>, em exposição por 96 horas. Já Al-Sawafi; Wang; Yan (2017), observaram valor de CL<sub>50</sub> igual a 9,68 mg L<sup>-1</sup> para animais adultos em exposição por 96 horas. Esses resultados nos mostram que os estágios de vida dos animais influenciam a sensibilidade ao CdCl<sub>2</sub>, possibilitando alterações no desenvolvimento, muitas vezes incompatíveis com a vida do organismo.

A mesma característica é observada na classe Amphibia, Ferrari; Salibán; Muiño (1993) avaliaram a espécie de sapo de areia *Rhinella arenarum* (anteriormente denominado *Bufo arenarum*) e obtiveram CL<sub>50</sub> diferente para o estágio de vida de

girinos, mas avaliando em tempos de exposição diferentes o que ressalta ser também um fator extremamente relevante.

Um compilado de estudos e valores de  $CL_{50}$  encontrados em diferentes espécies de gastrópodes (Tabela 2) e de peixes (Tabela 3) estão descritos abaixo. Os dados nos permitem avaliar as semelhanças e diferenças com os resultados obtidos nesse estudo e, além disso, nos mostram a diversidade das variáveis que devem ser observadas, como o tempo de exposição e estágio do desenvolvimento do organismo.

Além da mortalidade, como presenciado nas duas espécies estudadas, é de extrema importância avaliar respostas iniciais que podem ocasionar problemas nas populações, como por exemplo alterações no comportamento dos organismos. Em gastrópodes é possível verificar além de eventos comuns a diferentes espécies, respostas aos contaminantes que são espécie-específica. *L. stagnalis* apresentou o corpo distendido para fora da concha e com a abertura voltada para cima, como descrito na OECD (2016a); para *B. glabrata* foi possível verificar a liberação de hemolinfa e corpo retraído para dentro da concha, como observado por Tallarico *et al.* (2014) e Garcia *et al.* (2021). Nas duas espécies foi possível verificar alteração de locomoção e dificuldade na alimentação. Outros efeitos comportamentais podem ser observados em gastrópodes, como por exemplo, a superexposição peniana ocorrida como resposta ao detergente presente nos efluentes têxteis (Garcia *et al.*, 2021) e ao fármaco metiotepina (Muschamp; Fong, 2001). A avaliação de perturbações nos animais expostos, podem nos trazer informações precoces sobre a periculosidade de compostos no ambiente aquático (Rand; Wells; Mccarty, 1995).

Os resultados investigados nos caramujos adultos das espécies *B. glabrata* e *L. stagnalis* foram similares, sinalizando que a espécie nativa é sensível e responsiva para ser utilizado em ensaios ecotoxicológicos, como já descrito anteriormente por Oliveira-Filho; Nakano; Tallarico (2017). Os ensaios de ecotoxicidade aguda utilizando a substância de referência, o  $CdCl_2$ , é usualmente utilizada em laboratórios de análises ambientais. A análise comparativa entre as duas espécies de gastrópodes possibilitou a definição das concentrações da substância teste para dar continuidade nos ensaios ecotoxicológicos crônicos. Os ensaios crônicos vêm sendo amplamente investigados com o objetivo de extrapolar para a realidade ambiental, avaliando os efeitos a longo prazo causados nos animais, as baixas doses de exposições ambientais e a bioacumulação nos organismos. Embora os testes crônicos sejam

preconizados para a avaliação dos efeitos dos contaminantes, pouco são os ensaios normatizados e ainda não são exigidos pelos órgãos legisladores no Brasil.

Uma vantagem do uso de *B. glabrata* em ensaios ecotoxicológicos em países com clima tropical é que a quantidade de solução-teste utilizada e conseqüentemente o descarte de resíduos é menor, diminuindo também o investimento econômico no ensaio. Para *L. stagnalis*, são utilizados cinco adultos por litro de água, segundo a OECD (2016a). Já para ensaios com peixes da família Cyprinidae, segundo a ABNT (NBR 15088:2022) recomenda o uso de um grama de animal por litro de água, correspondendo a cinco animais de aproximadamente 200 miligramas por litro de água para testes de toxicidade agudos. Com as bionfalárias, foram utilizados 10 animais expostos em 180 ml de solução e foram obtidos resultados compatíveis com a literatura.

**Tabela 2** - Relação de estudos sobre a toxicidade ao cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) em variadas espécies do Filo Mollusca.

Filo	Classe	Espécie	Estágio de vida	Tempo de exposição	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Referência
Mollusca	Gastropoda	<i>Amphibola crenata</i>	Adultos	48 horas	50,400	De Silva <i>et al.</i> , 2023
		<i>Babylonia areolata</i>	Jovens	96 horas	3,350	Tanhan <i>et al.</i> , 2005
		<i>Biomphalaria alexandrina</i>	Adultos	96 horas	0,219	Habib <i>et al.</i> , 2016
		<i>Biomphalaria glabrata</i>	Adultos	96 horas	0,340	Cantinha <i>et al.</i> , 2017
		<i>Biomphalaria glabrata</i>	Adultos	24 horas	0,480	Este estudo
		<i>Lymnaea acuminata</i>	Adultos	24 horas	9,660	Dhara; Saha; Maiti, 2017
			Adultos	96 horas	5,540	
		<i>Lymnaea luteola</i>	Adultos	7 dias	0,496	Das; Khangarot, 2010
			Adultos	49 dias	0,043	
		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Adultos	56 dias	0,098 - 0,199	Ducrot <i>et al.</i> , 2014
		<i>Lymnaea stagnalis</i>	Adultos	24 horas	0,330	Este estudo
		<i>Physa acuta</i>	Adultos	28 dias	0,038	Crespo; Rossini, 2021
		<i>Pomacea canaliculata</i>	Adultos	48 horas	4,260	Huang <i>et al.</i> , 2018
			Adultos	96 horas	1,980	
		<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Juvenis	28 dias	0,038	Ruppert <i>et al.</i> , 2016
			Adultos	28 dias	0,015	
		<i>Sinotaia quadrata</i>	Adultos	48 horas	1,500	Huang <i>et al.</i> , 2018
	Adultos	96 horas	0,660			
<i>Turbo intercostalis</i>	Adultos	96 horas	6,180	Lakshmi; Rao, 2002		

Fonte: próprio autor.

**Tabela 3** - Relação de estudos sobre a toxicidade ao cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>) em variadas espécies do Filo Chordata.

Filo	Classe	Espécie	Estágio de vida	Tempo de exposição	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Referência		
Chordata	Actinopterygii	<i>Danio rerio</i>	Larvas	96 horas	6,840	Hu <i>et al.</i> , 2022		
			Adultos	24 horas	16,730	Al-sawafi; Wang; Yan, 2017		
			Adultos	96 horas	9,680			
				<i>Heteropneustes fossilis</i>	Adultos	14 dias	300,000	Das; Banerjee, 1980
				<i>Pagrus major</i>	Embriões	24 horas	9,800	
					Embriões	48 horas	6,600	
					Larvas	24 horas	18,900	Cao <i>et al.</i> , 2009
					Larvas	48 horas	16,200	
				Larvas	72 horas	8,000		
					Larvas	96 horas	5,600	
			<i>Trichogaster fasciata</i>	Adultos	96 horas	49,500	Roy; Karmakar; Pal, 2022	
	Amphibia		<i>Rhinella arenarum</i> ( <i>Bufo arenarum</i> )	Girinos	24 horas	4,050		
				Girinos	48 horas	3,150	Ferrari; Salibán; Muiño, 1993	
				Girinos	72 horas	2,870		
Girinos				96 horas	2,650			
				<i>Pelophylax ridibundus</i> ( <i>Rana ridibunda</i> )	Adultos	96 horas	51,200	Selvi; Gül; Yilmaz, 2003

Fonte: próprio autor.



## 6 CONCLUSÕES

Com os ensaios ecotoxicológicos realizados com cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) em adultos de caramujos das espécies *Biomphalaria glabrata* e *Lymnaea stagnalis* foi possível estabelecer parâmetros físico-químicos para ensaios laboratoriais com Boas Práticas de Laboratório, confiabilidade e reprodutibilidade. As faixas de pH indicadas para os ensaios são de  $7 \pm 2$ , condutividade de  $150\text{-}270 \mu\text{S cm}^{-1}$ , dureza da água em torno de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  e a temperatura ambiente de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A utilização de uma espécie representativa de ecossistemas de regiões tropicais, como a *B. glabrata*, é uma ferramenta importante e recomendada para o monitoramento e avaliação de substâncias/produtos químicos, efluentes e águas continentais com maior significado ambiental para o Brasil e América Latina. A utilização de gastrópodes mostrou-se relevante como alternativa ao uso de animais vertebrados como indicado em vários países. Os dados de ecotoxicidade aguda são importantes para o estabelecimento de ensaios crônicos com adultos e embriões e para a obtenção de dados mais robustos para a normatização dos ensaios com as bionfalárias.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AL-FANHARAWI, A. A.; RABEE, A. M.; AL-MAMOORI, A. M. J. Biochemical and molecular alterations in freshwater mollusks as biomarkers for petroleum product, domestic heating oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 69-77, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.006>. Acesso em: 05 dez. 2023.

AL-SAWAFI, A. G. A.; WANG, L.; YAN, Y. Cadmium Accumulation and Its Histological Effect on Brain and Skeletal Muscle of Zebrafish. **Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases**, v. 02, n. 01, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21767/2473-6457.100017>. Acesso em: 05 dez. 2023.

AMEN, R. I. *et al.* *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis*: A flow cytometric approach to study its effects on hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, n. 1, p. 95-98, jan. 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90117-m](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90117-m). Acesso em: 05 dez. 2023.

AMORIM, J. *et al.* *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. **Science of The Total Environment**, v. 669, p. 11-28, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>. Acesso em: 05 dez. 2023.

ANSALDO, M. *et al.* Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1923-1928, mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.001>. Acesso em: 30 dez. 2023.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; ZHANG, X. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 1, p. 60-64, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11802-008-0060-y>. Acesso em: 05 dez. 2023.

AZIMI, A. *et al.* Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters: A Review. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 1, p. 37-59, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cben.201600010>. Acesso em: 05 dez. 2023.

BAROUDI, F. *et al.* Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. **Ecological Indicators**, v. 113, p. 106240, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106240>. Acesso em: 05 dez. 2023.

BENKENDORFF, K. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. **Biological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 757-775, jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2010.00124.x>. Acesso em: 05 dez. 2023.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Informação e documentação – Citações em documentos - Apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2023.

CAIXETA, M. B. *et al.* Biomphalaria spp. embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing standard protocols. **Science of The Total Environment**, p. 155211, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155211>. Acesso em: 30 dez. 2023.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.145>. Acesso em: 05 dez. 2023.

CANTINHA, R. S. *et al.* HSP70 expression in *Biomphalaria glabrata* snails exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 18-23, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.026>. Acesso em: 05 dez. 2023.

CAO, L. *et al.* Cadmium toxicity to embryonic–larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1966-1974, out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.06.002>. Acesso em: 05 dez. 2023.

COEURDASSIER, M. *et al.* Effects of Cadmium on the Survival of Three Life-Stages of the Freshwater Pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, n. 5, maio 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0354-8>. Acesso em: 05 dez. 2023.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 142, n. 53, p. 58, 18 de março 2005.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 148, n. 92, p. 89, 16 de maio 2011.

COONEY, J. D.; Freshwater tests. In: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington, D. C., Taylor & Francis, 1995. 2º Ed., cap. 2, p. 71-102.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000700038>. Acesso em: 05 dez. 2023.

CRESPO, E. B.; ROSSINI, G. B. Comparative Assessment of Cadmium and Copper Toxicity to *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 378-384, 28 mar. 2021.

CZECH, P.; WEBER, K.; DIETRICH, D. R. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 103-114, jul. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00169-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00169-7). Acesso em: 30 dez. 2023.

DAS, S.; KHANGAROT, B. S. Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1-3, p. 763-770, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.100>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DAS, K. K.; BANERJEE, S. K. Cadmium toxicity in fishes. **Hydrobiologia**, v. 75, n. 2, p. 117-121, out. 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00007424>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DE SILVA, N. A. L. *et al.* Physiological and biochemical responses of the estuarine pulmonate mud snail, *Amphibola crenata*, sub-chronically exposed to waterborne cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 256, p. 106418, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106418>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DE-CARVALHO, R. R. *et al.* Evaluation of the developmental toxicity of solvents, metals, drugs, and industrial chemicals using a freshwater snail (*Biomphalaria glabrata*) assay. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, p. 1-17, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2089413>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DELFINA, M. R. *et al.* Toxicological Effects of Differently Polluted Dam Waters Spiked with Pesticides on Freshwater Snails *Lymnaea Natalensis*. **International Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 1-8, maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5539/ijc.v8n3p1>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DHARA, K.; SAHA, N. C.; MAITI, A. K. Studies on acute and chronic toxicity of cadmium to freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck) with special reference to behavioral and hematological changes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27326-27333, 2 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0349-8>. Acesso em: 05 dez. 2023.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2008. cap. 8, p.153-184.

DUCROT, V. *et al.* Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 605-614, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.09.004>. Acesso em: 05 dez. 2023.

ELHE – Setor de Ecotoxicologia Aquática. **Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos: Atendimento à legislação Ambiental - Orientações para realização de ensaios e apresentação dos resultados nos documentos**

**encaminhados à CETESB.** In: Seminário – Ensaio Ecotoxicológicos com Organismos Aquáticos Atendimento à Legislação Ambiental. São Paulo: Escola Superior da CETESB, 2017.

FERRARI, L.; SALIBIÁN, A.; MUIÑO, C. V. Selective protection of temperature against cadmium acute toxicity to *Bufo arenarum* tadpoles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, fev. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00191724>. Acesso em: 05 dez. 2023.

FODOR, I. *et al.* The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. **eLife**, v. 9, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/elife.56962>. Acesso em: 05 dez. 2023.

GOMOT, A. Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, n. 3, p. 288-297, nov. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1711>. Acesso em: 05 dez. 2023.

GARCIA, V. S. G. *et al.* Multiple adverse effects of textile effluents and reactive Red 239 dye to aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, 5 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15115-7>. Acesso em: 24 jan. 2024.

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, jun. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.007>. Acesso em: 30 dez. 2023.

HABIB, M. R. *et al.* *Biomphalaria alexandrina* as a bioindicator of metal toxicity. **Chemosphere**, v. 157, p. 97-106, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.012>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HAO, Z. *et al.* Heavy metal distribution and bioaccumulation ability in marine organisms from coastal regions of Hainan and Zhoushan, China. **Chemosphere**, v. 226, p. 340-350, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.132>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HEIM, S.; SCHWARZBAUER, J. Pollution history revealed by sedimentary records: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 255-270, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0409-3>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 8 jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HICKMAN C. P. *et al.*; Moluscos. In: HICKMAN C. P. *et al.* **Princípios Integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2016. 16º Ed., cap. 16, 1405 p.

HORTON, A. A. *et al.* Accumulation of polybrominated diphenyl ethers and microbiome response in the great pond snail *Lymnaea stagnalis* with exposure to nylon (polyamide) microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, e109882, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109882>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HU, G. *et al.* Combined toxicities of cadmium and five agrochemicals to the larval zebrafish (*Danio rerio*). **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 26 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20364-8>. Acesso em: 05 dez. 2023.

HUANG, F. *et al.* Cadmium bioaccumulation and antioxidant enzyme activity in hepatopancreas, kidney, and stomach of invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18682-18692, 29 abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2092-1>. Acesso em: 05 dez. 2023.

KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L., orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. Part. II, cap. 10, p. 347-391.

KENDALL, S. B. *Lymnaea stagnalis* as an Intermediate Host of Fasciola hepatica. **Nature**, v. 163, n. 4153, p. 880-881, jun. 1949. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/163880a0>. Acesso em: 05 dez. 2023.

KURODA, R.; ABE, M. The pond snail *Lymnaea stagnalis*. **EvoDevo**, v. 11, n. 1, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00169-4>. Acesso em: 05 dez. 2023.

LAGADIC, L.; COUTELLEC, M.; CAQUET, T. Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 45-59, 5 jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0114-0>. Acesso em: 30 dez. 2023.

LAKSHMI, P. S.; RAO, Y. P. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 134, n. 1/4, p. 229-238, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1014199321206>. Acesso em: 05 dez. 2023.

LANCE, E. *et al.* Interactions between cyanobacteria and Gastropods. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 140-148, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.004>. Acesso em: 05 dez. 2023.

LANZER, R. *et al.* Comparação de Testes Ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphnia magna* (Straus, 1820) utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.5132/jbse.2007.01.004>. Acesso em: 05 dez. 2023.

LIU, J.; GOYER, R.A; WAALKES, M. P. Toxic Effects of Metals. In: Klaassen C. D. **Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2008. 7<sup>o</sup> Ed., cap. 23, p. 931-980.

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 1, p. 3-15, mar. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00262-5](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00262-5). Acesso em: 05 dez. 2023.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A. Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARSHALL, D. J. *et al.* Biomonitoring acidification using marine gastropods. **Science of The Total Environment**, v. 692, p. 833-843, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.041>. Acesso em: 05 dez. 2023.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c0em00787k>. Acesso em: 05 dez. 2023.

MUSCHAMP, J. W.; FONG, P. P. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: Reduction of egg laying and induction of penile erection. **Journal of Experimental Zoology**, v. 289, n. 3, p. 202-207, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-010x\(20010215\)289:3%3C202::aid-jez7%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-010x(20010215)289:3%3C202::aid-jez7%3E3.0.co;2-b). Acesso em: 24 jan. 2024.

MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. **Environmental Technology Letters**, v. 8, n. 1-12, p. 141-148, jan. 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593338709384472>. Acesso em: 05 dez. 2023.

NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. The dominant lethal test in the snail *Biomphalaria glabrata*: an assay to detection of germ cell mutagens in freshwater for environmental monitoring. In: VALON, C. L. **New developments in mutation research**. New York: Nova Science Publishers, 2007. Cap. 8, p. 189-215.

NIKINMAA, M. **Introduction to Aquatic Toxicology**. [S. l.]: Elsevier Science & Technology Books, 2014. 252 p.

OECD. Guideline for the testing of chemicals. *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test. **Organisation for Economic Co-operation and Development**. N. 243: Paris, France, 2016a.

OECD. Guideline for the testing of chemicals. *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test. **Organisation for Economic Co-operation and Development**. N. 242: Paris, France, 2016b.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U. Molluscs as bioindicators. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and Biomonitoring**. [S. l.]: Elsevier Science & Technology Books, 2003. 1º Ed., v. 6, cap. 17, p. 577-635.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 61, n. 1, p. 49-57, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07924259.2016.1276484>. Acesso em: 05 dez. 2023.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 110-118, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>. Acesso em: 05 dez. 2023.

PASCOE, D.; EVANS, S. A.; WOODWORTH, J. Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 481-487, set. 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01056559>. Acesso em: 30 dez. 2023.

PERUZZO, L.C. Classificação das substâncias tóxicas. In: PERUZZO, L.C. **Toxicologia e segurança**. Indaial: UNIASSELVI, 2018. Unidade 1, tópico 3, p. 35-62.

PINHEIRO, M. C. C. *et al.* Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial-temporal distribution, 2003-2018. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 11, p. 1395-1407, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tmi.13483>. Acesso em: 05 dez. 2023.

PONDER, W. F.; LINDBERG, D. R.; PONDER, J. M. **Biology and Evolution of the Mollusca**. [S. l.]: CRC Press, 2020. *E-book*. 1º Ed., vol. 2. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781351115254>. Acesso em: 05 dez. 2023.

QUINN, B. *et al.* The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 279-292, fev. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.007>. Acesso em: 05 dez. 2023.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Toxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington, D. C., Taylor & Francis, 1995. 2º Ed, cap. 1, p. 3-67.

REÁTEGUI-ZIRENA, E. G. *et al.* Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to cadmium. **Environmental Pollution**, v. 224, p. 572-580, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.040>. Acesso em: 05 dez. 2023.



REÁTEGUI-ZIRENA, E. G.; SALICE, C. J. Parental diet affects embryogenesis of the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) exposed to cadmium, pyraclostrobin, and tributyltin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 9, p. 2428-2438, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.4202>. Acesso em: 05 dez. 2023.

RITTSCHOF, D.; MCCLELLAN-GREEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Marine Pollution Bulletin**. v. 50, n. 4, p. 369-373, abr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.008>. Acesso em: 30 dez. 2023.

ROY, S.; KARMAKAR, D.; PAL, S. Acute Toxicity Bioassay and Determination of LC50 of Cadmium Chloride in *Trichogaster (Colisa) fasciata*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 12 maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03953-1>. Acesso em: 05 dez. 2023.

RUPPERT, K. *et al.* Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Gastropoda). **Chemosphere**, v. 181, p. 589-599, ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.114>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SALICE, C. J.; MILLER, T. J.; ROESIJADI, G. Demographic Responses to Multigeneration Cadmium Exposure in Two Strains of the Freshwater Gastropod, *Biomphalaria glabrata*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 4, p. 785-795, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9203-9>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SELVI, M; GÜL, A.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (*Rana ridibunda* Pallas, 1771). **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 259-263, jul. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(03\)00262-5](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(03)00262-5). Acesso em: 05 dez. 2023.

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, M. *et al.* (ed.). **Ecologia de Reservatórios e Interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2015. p. 472 Disponível em: <https://doi.org/10.11606/9788585658526>. Acesso em: 05 dez. 2023.

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.

SOLDÁNOVÁ, M.; KOSTADINOVA, A. Rapid colonisation of *Lymnaea stagnalis* by larval trematodes in eutrophic ponds in central Europe. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 9, p. 981-990, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.05.005>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SQUID, G. *et al.* Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. **Ecotoxicology and Environmental**

**Safety**, v. 89, p. 1-7, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.015>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SUMMER, K. *et al.* Molluscan Compounds Provide Drug Leads for the Treatment and Prevention of Respiratory Disease. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 570, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md18110570>. Acesso em: 05 dez. 2023.

TALLARICO, L. F. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America\*. **American Malacological Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 330-336, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>. Acesso em: 05 dez. 2023.

TALLARICO, L. T.; MIYASATO, P. A.; NAKANO, E. Rearing and Maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and Embryos under Laboratory Conditions. **Annals of Aquaculture and Research**. Jun. 2016. Acesso em: 05 dez. 2023.

TALLARICO, L.F. **Avaliação dos efeitos tóxicos e mutagênicos de amostras ambientais do Rio Tietê na região de Suzano em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**. 2009. 135 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. DOI <https://doi.org/10.11606/T.85.2009.tde-23062009-183447>. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-23062009-183447/pt-br.php>. Acesso em: 05 dez. 2023.

TALLARICO, L.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, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.005>. Acesso em: 30 dez. 2023.

TANHAN, P. *et al.* Histopathological alterations in the edible snail, *Babylonia areolata* (spotted babylon), in acute and subchronic cadmium poisoning. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 142-149, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.20088>. Acesso em: 05 dez. 2023.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A. Moluscos Límnicos em reservatórios de usinas hidrelétricas no Brasil: aspectos biológicos e epidemiológicos. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L., orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. Part. II, cap. 13, p. 435-457.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, SP, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 279-283, mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1676-06032009000100031>. Acesso em: 05 dez. 2023.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Aquatic life ambiente: water quality criteria – cadmium**. Washington, D.C.: US Environmental Protection

Agency, 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/wqc/aquatic-life-criteria-cadmium>. Acesso em: 05 dez. 2023.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Deriving Numerical National Water Quality Criteria for the Protection of Aquatic Organisms and Their Uses**. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 1985. 59 p. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-02/documents/guidelines-water-quality-criteria.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2023.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluent to freshwater and marine organisms**. 5ª Ed. Washington, D.C.: US Environmental Protection Agency, 2002. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf). Acesso em: 05 dez. 2023.

WHO. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. **Environmental health criteria; 135**. Cadmium: environmental aspects. Geneva, 101 p., 1992. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39366>. Acesso em: 8 dez. 2023.

WHO. *World Health Organization*. **Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks**. Meeting report, 147 p., 2016. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565196>. Acesso em: 8 dez. 2023.

WHYTE, A. L. H. *et al.* Human dietary exposure to heavy metals via the consumption of greenshell mussels (*Perna canaliculus* Gmelin 1791) from the Bay of Islands, northern New Zealand. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 14, p. 4348-4355, jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.011>. Acesso em: 05 dez. 2023.

ZAGATTO, P. A. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP, RiMa, 2006. 2ª Ed., cap. 8, p. 156-184.

ZALA, S. M.; PENN, D. J. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. **Animal Behaviour**. v. 68, n. 4, p. 649-664, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.01.005>. Acesso em: 30 dez. 2023.

ZAMORA-LEDEZMA, C. *et al.* Heavy metal water pollution: A fresh look about hazards, novel and conventional remediation methods. **Environmental Technology & Innovation**, v. 22, e101504, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>. Acesso em: 05 dez. 2023.