

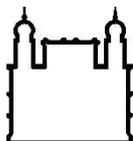
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

**Caracterização espectrofotométrica, ultraestrutural e química das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil: diferenciação interespecífica e parasitológica por meio do NIR**

Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos

Caracterização espectrofotométrica, ultraestrutural e química das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil: diferenciação interespecífica e parasitológica por meio do NIR

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

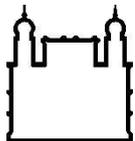
**Orientador (es):**

Dra. Silvana Carvalho Thiengo

Dra. Clélia Christina Mello-Silva

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Valladares Cardoso Monteiro dos Santos, Vanessa .

Caracterização espectrofotométrica, ultraestrutural e química das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil: diferenciação interespecífica e parasitológica por meio do NIR / Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos. - Rio de Janeiro, 2021.

85f f.; il.

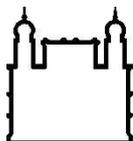
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2021.

Orientadora: Silvana Carvalho Thiengo.

Co-orientadora: Clélia Christina Mello-Silva.

Bibliografia: f. 78-85

1. Espectrofotômetro. 2. *Biomphalaria* . 3. Diferenciação de espécies. 4. Esquistossomose . 5. Diagnóstico parasitológico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos**

Caracterização espectrofotométrica, ultraestrutural e química das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil: diferenciação interespecífica e parasitológica por meio do NIR

**Orientador (es):** Dr<sup>a</sup> Silvana Carvalho Thiengo  
Dr<sup>a</sup> Clélia Christina Mello-Silva

**EXAMINADORES:**

**Presidente Dra.** Cláudia Portes Santos Silva

**Prof. Dr.** Célio Pasquini

**Prof. Dr.** Jairo Pinheiro da Silva

**Dra.** Gabriela Azambuja Garcia

**Dra.** Marta Julia Faro dos Santos Costa

Rio de Janeiro, 26 de janeiro de 2021

*" Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças. "*

**Charles Darwin**

## AGRADECIMENTOS

Esperei muito por um momento em que eu estivesse “inspirada” para escrever esses agradecimentos de forma especial, até que eu percebi que não preciso de inspiração para agradecer. Eu simplesmente sou grata e espero conseguir expressar essa gratidão na mesma intensidade que a sinto.

Vivi o sonho do mestrado muito intensamente desde a aprovação e devo todo o percurso, principalmente, à Deus que permitiu que tudo se tornasse possível. Reforcei a minha fé e reconheci que tudo tem um momento certo para acontecer, tudo no tempo Dele, não no nosso.

Agradeço aos meus pais, Sandra Elena Cardoso Monteiro e Roberto Valladares dos Santos, e ao meu irmão, Felipe Valladares, que são a minha base e estão comigo em qualquer circunstância e por serem um exemplo que eu quero seguir. À minha avó Amélia da Conceição que, assim como minha mãe, me ensinaram a ser uma mulher forte e a nunca desistir. Ao meu avô Bento Monteiro Tralhão que sempre me passou a tranquilidade e a paciência de um sábio. A minha família, todo o meu amor e gratidão.

Ao amor da minha vida, Leonardo Bezerra de Oliveira, que me faz viver e confiar no hoje e agora. Obrigada por estar ao meu lado e me incentivar nessa trajetória! Meus dias se tornaram ainda mais felizes desde que você começou a fazer parte deles.

Às minhas orientadoras, que me ofereceram todo o suporte e paciência para a realização desse trabalho. Em especial à minha segunda mãe, Clélia Christina Mello Silva, que é a melhor pessoa que eu poderia escolher para fazer parte da minha vida. Obrigada por não desistir de mim, pela amorosidade que transborda, por toda a ajuda e por ser você, única!

Aos meus amigos da vida que se fizeram presentes, mesmo com todas as circunstâncias. Em especial, à Gabriela Friani, a irmã que a vida me deu, que sempre se dispôs a me ajudar e me escutar em qualquer situação (merece um prêmio por isso). Saibam que podem sempre contar comigo!

Às meninas do laboratório e ao “seu Bidi”, que animaram os meus dias durante esse trajeto e sempre ofereceram palavras de incentivo. Obrigada Érica Tex Paulino, por toda a ajuda oferecida!

Por fim, agradeço ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental e ao Laboratório de Malacologia pela parceria e auxílio em todo material analisado nesse trabalho. E, também, ao grupo de pesquisa Saúde e educação ambiental com ênfase nas relações parasitárias, o qual faço parte.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Manto de um exemplar adulto de *Biomphalaria glabrata*, onde se vê a crista renal (seta); (B) manto de um exemplar jovem com a linha renal pigmentada. Coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), linha renal pigmentada (lr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn) ..... 14
- Figura 2.** Sistema genital de *Biomphalaria glabrata*. Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano [retrator (mr) e protrator (mp)], prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), bolsa vaginal (bv), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut)..... 15
- Figura 3.** (A) Sistema genital de *Biomphalaria tenagophila*. Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano [retrator (mr) e protrator (mp)], prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), bolsa vaginal (bv), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut). Fonte: PARAENSE, 2008. (B) Manto de um exemplar de *B. tenagophila* sem a presença de crista renal. Coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn). ..... 16
- Figura 4.** (A) Manto de um exemplar de *Biomphalaria straminea* sem a presença de crista renal. Coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn). (B) Sistema genital de *B. straminea* destacando o enrugamento vaginal (seta). Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano [retrator (mr) e protrator (mp)], prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), enrugamento vaginal (ev), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut). ..... 17
- Figura 5:** Esquema representando o ciclo de transmissão da esquistossomose, evidenciando os hospedeiros definitivos (mamífero) e intermediário (caramujo *Biomphalaria*) e as principais fases de *Schistosoma mansoni* ..... 22
- Figura 6:** NIR com transformada de Fourier (FT-NIR) da marca e modelo ABB Boomem MB 3600 e o computador de uso exclusivo do equipamento..... 32
- Figura 7:** (A) FT-NIR com Powder Sampler. (B) Frasco de vidro com um espécime vivo de *Biomphalaria glabrata* pronto para ser medido no FT-NIR através da janela do equipamento ..... 34
- Figura 8:** Procedimento para a separação da concha da parte mole dos moluscos. .... 35
- Figura 9:** Detalhe da janela do NIR e no detalhe com seta, a posição da concha na janela de emissão do NIR com o lado sinistro voltado para baixo..... 35
- Figura 10:** Exposição dos caramujos infectados a luz artificial para verificar a eliminação de cercarias ..... 37
- Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria glabrata*. (A) Imagem total da população de laboratório; (B) área desgastada do umbigo da população de laboratório; (C) imagem das últimas voltas da população de laboratório; (D) Imagem total da população de campo; (E) área desgastada do umbigo da população de campo; (F) imagem das últimas voltas da população de campo .....41
- Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria tenagophila*. (A) Imagem total da população de laboratório; (B) área desgastada do umbigo da população de laboratório; (C)

imagem das últimas voltas da população de laboratório; **(D)** Imagem total da população de campo; **(E)** área desgastada do umbigo da população de campo; **(F)** imagem das últimas voltas da população de campo .....42

**Figura 13:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria straminea*. **(A)** Imagem total da população de laboratório; **(B)** área desgastada do umbigo da população de laboratório; **(C)** imagem das últimas voltas da população de laboratório; **(D)** Imagem total da população de campo; **(E)** área desgastada do umbigo da população de campo; **(F)** imagem das últimas voltas da população de campo .....43

**Figura 14:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria* spp. para evidenciar as camadas da concha. **(A)** Imagem dos cristais de cálcio expostos de *Biomphalaria glabrata* população de laboratório; **(B)** área desgastada da concha de *Biomphalaria glabrata* população de campo com a exposição da camada prismática; **(C)** área desgastada do umbigo de *Biomphalaria straminea* população de campo evidenciando a camada nacarada..... 44

**Figura 15:** Gráficos dos resultados semi-quantitativos (%) dos elementos químicos presentes nas conchas de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* .....48

**Figura 16:** *Boxplot* da concentração dos elementos químicos identificados no MEV/EDS entre as espécies *Biomphalaria glabrata* (BG), *Biomphalaria straminea* (BS) e *Biomphalaria tenagophila* (BT). **(A)** carbono, **(B)** oxigênio, **(C)** cálcio, **(D)** nitrogênio, **(E)** ferro, **(F)** fósforo, **(G)** sódio, **(H)** silício e **(I)** flúor. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....49

**Figura 17:** Comparação da concentração do elemento oxigênio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....50

**Figura 18:** Comparação da concentração do elemento cálcio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....51

**Figura 19:** Comparação da concentração do elemento cálcio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, com relação à origem (campo ou laboratório) e à integridade da Matriz (Inorgânica ou Orgânica). Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  ..... 52

**Figura 20:** Comparação da concentração do elemento nitrogênio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....53

**Figura 21:** Comparação da concentração do elemento ferro entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  .....54

**Figura 22:** Comparação da concentração do elemento ferro entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, com relação à origem (campo ou laboratório) e à integridade da Matriz (Inorgânica ou Orgânica). Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  ..... 55

**Figura 23:** Comparação da concentração do elemento fósforo entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  ..... 56

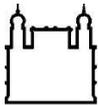
**Figura 24:** Comparação da concentração do elemento silício entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ..... 56

**Figura 25:** Comparação da concentração do elemento flúor entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ..... 57

<b>Figura 26:</b> Análise de componentes principais do mesmo grupo de conchas em posicionamentos diferentes da concha sobre a janela do equipamento: (A) lado direito ou destro e (B) lado esquerdo ou sinistro. Sendo, (Bg): <i>Biomphalaria glabrata</i> ; (Bt): <i>Biomphalaria tenagophila</i> ; (Bs): <i>Biomphalaria straminea</i> .....	59
<b>Figura 27:</b> Análise de componentes principais dos resultados obtidos de conchas de <i>Biomphalaria</i> spp. em diferentes períodos de secagem .....	60
<b>Figura 28:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de diferentes populações de laboratório e campo .....	61
<b>Figura 29:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de populações de laboratório .....	62
<b>Figura 30:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de populações de campo.....	63
<b>Figura 31:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria glabrata</i> de mesma população de laboratório e de campo .....	63
<b>Figura 32:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria tenagophila</i> de mesma população de laboratório e de campo .....	64
<b>Figura 33:</b> Análise de componentes principais de espécimes vivos de <i>Biomphalaria straminea</i> de mesma população de laboratório e de campo .....	64
<b>Figura 34:</b> Análise de componentes principais de conchas de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de diferentes populações de laboratório e de campo .....	65
<b>Figura 35:</b> Análise de componentes principais de conchas de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de populações de laboratório.....	66
<b>Figura 36:</b> Análise de componentes principais de conchas de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i> de populações de campo.....	67
<b>Figura 37:</b> Análise de componentes principais das amostras de espécimes vivos infectados (grupo pós-triagem) e não expostos à infecção (grupo controle) de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Sendo, (BgIS): <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada; (BgNIS): <i>Biomphalaria glabrata</i> não exposta à infecção .....	68
<b>Figura 38:</b> Análise de componentes principais das amostras de espécimes vivos infectados (grupo pré-triagem) e expostos à infecção, porém, negativos de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de espécimes de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>B. tengophila</i> e de <i>B. straminea</i> analisados por espécie e população .....	29
<b>Tabela 2:</b> Datas e pontos de coleta de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>B. tengophila</i> e de <i>B. straminea</i> , com coordenadas geográficas .....	30
<b>Tabela 3:</b> Quantidade de cercárias eliminadas por cada um dos espécimes de <i>Biomphalaria glabrata</i> positivos para <i>Schistosoma mansoni</i> .....	38
<b>Tabela 4:</b> Distribuição dos elementos químicos nas conchas de <i>Biomphalaria glabrata</i> , de acordo com a origem das conchas (campo ou laboratório), a matriz da concha (orgânica ou inorgânica) e a região da concha em que foi observada (umbigo ou última volta).....	46
<b>Tabela 5:</b> Distribuição dos elementos químicos nas conchas de <i>Biomphalaria tenagophila</i> , de acordo com a origem das conchas (campo ou laboratório), a matriz da concha (orgânica ou inorgânica) e a região da concha em que foi observada (umbigo ou última volta).....	46
<b>Tabela 6:</b> Distribuição dos elementos químicos nas conchas de <i>Biomphalaria straminea</i> , de acordo com a origem das conchas (campo ou laboratório), a matriz da concha (orgânica ou inorgânica) e a região da concha em que foi observada (umbigo ou última volta).....	47
<b>Tabela 7:</b> Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de <i>Biomphalaria</i> analisada a partir do modelo de classificação total, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).....	61
<b>Tabela 8:</b> Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de <i>Biomphalaria</i> analisada a partir do modelo de classificação de laboratório, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA) .....	62
<b>Tabela 9:</b> Taxas de classificação de acertos de cada espécie de <i>Biomphalaria</i> analisada a partir de amostras da mesma população coletadas em campo e mantidas em laboratório, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA) .....	65
<b>Tabela 10:</b> Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de <i>Biomphalaria</i> analisada utilizando somente conchas de laboratório e campo, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).....	66
<b>Tabela 11:</b> Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de <i>Biomphalaria</i> analisada, utilizando somente conchas de campo, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA) .....	67



## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização espectrofotométrica, ultraestrutural e química das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil: diferenciação interespecífica e parasitológica por meio do NIR

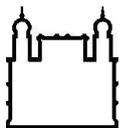
### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos

A esquistossomose mansoni, parasitose de veiculação hídrica causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* e transmitida por moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, ainda representa um problema de saúde pública no Brasil. A caracterização das três espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil é importante sob o ponto de vista epidemiológico, já que cada uma apresenta características biológicas e fisiológicas diferentes na manutenção do ciclo do parasito. Dessa forma, a proposta desse trabalho foi descrever as características espectrofotométricas, ultraestruturais e químicas de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, bem como de exemplares de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*, provenientes de laboratório e campo, buscando a diferenciação entre essas espécies e a detecção de infecção. Diferentes populações das três espécies de *Biomphalaria* utilizadas foram mantidas no Laboratório de Malacologia/IOC/Fiocruz, sendo parte delas coletadas em campo. Foram obtidos no Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo (NIR), espectros de 598 moluscos vivos, sendo 100 espécimes infectados para o diagnóstico parasitológico, e 230 conchas. As análises quimiométricas foram realizadas utilizando-se o software Unscrambler®. Trinta conchas, de laboratório e de campo, foram descritas quanto à morfologia ultraestrutural e analisadas em relação aos elementos químicos através do MEV-EDS. A presença dos elementos químicos foi evidenciada nas áreas do umbigo e da última volta das conchas, com e sem perióstraco. A caracterização ultraestrutural diferenciou a camada prismática e o perióstraco e evidenciou a angulação nas conchas de *B. straminea* e *B. tenagophila*, demonstrando a carena dessa última espécie. Os elementos químicos primordiais da composição da concha (C, O, Ca e N) foram observados em todas as três espécies, além do ferro e do alumínio também. Elementos como Fe, Si e P foram encontrados em maior quantidade em conchas de campo, apresentando diferença significativa em relação as conchas de laboratório. A análise interespecífica de animais vivos foi possível através do NIR e a intraespecífica demonstrou as alterações químicas que podem ocorrer na mesma espécie de habitats diferentes. Todos os moluscos que passaram pelo equipamento, sobreviveram. A análise das conchas através do NIR apresentou variação interespecífica em relação as espécies de *Biomphalaria*. Além disso, foi possível separar os animais infectados dos não infectados com 82,5% de acerto. Concluindo, este trabalho ratificou a técnica NIRS como uma ferramenta inovadora na área da Malacologia médica, tanto na separação de espécies, quanto na detecção de exemplares infectados, o que é relevante principalmente para estudos da epidemiologia da transmissão da esquistossomose.

**Palavras-chave:** Esquistossomose, *Biomphalaria*, espectrofotômetro, diferenciação das espécies, diagnóstico parasitológico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Spectrophotometric, ultrastructural, and chemical characterization of the *Biomphalaria* intermediate host species of *Schistosoma mansoni* in Brazil: interspecific and parasitological differentiation through NIR

## ABSTRACT

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Vanessa Valladares Cardoso Monteiro dos Santos

Schistosomiasis mansoni, a waterborne parasitic disease caused by the trematode *Schistosoma mansoni* and transmitted by planorbid mollusks of the genus *Biomphalaria*, still represents a public health problem in Brazil. The characterization of the three species of *Biomphalaria* intermediate hosts of *S. mansoni* in Brazil is important from the epidemiological point of view, since each one presents different biological and physiological characteristics in the maintenance of the parasite cycle. Thus, the purpose of this study was to describe the spectrophotometric, ultrastructural and chemical characteristics of *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* and *B. tenagophila*, as well as of laboratory and field specimens of *B. glabrata* infected with *S. mansoni*, aiming to differentiate among these species and to detect infection. Different populations of the three *Biomphalaria* species used were kept at the Laboratory of Malacology/IOC/Fiocruz, and part of them were collected in the field. Spectra of 598 live mollusks were obtained in the Near Infrared Spectrophotometer (NIR), 100 of which were infected specimens for parasitological diagnosis, and 230 shells. Chemometric analyses were performed using Unscrambler® software. Thirty laboratory and field shells were described for ultrastructural morphology and analyzed for chemical elements using SEM-EDS. The presence of the chemical elements was evidenced in the navel and last lap areas of the shells, with and without periostraces. Ultrastructural characterization differentiated the prismatic layer and the periostrach and evidenced angulation in the shells of *B. straminea* and *B. tenagophila*, demonstrating the carina of the latter species. The primary chemical elements of shell composition (C, O, Ca, and N) were observed in all three species, in addition to iron and aluminum as well. Elements such as Fe, Si and P were found in higher amounts in field shells, showing a significant difference compared to laboratory shells. The interspecific analysis of live animals was possible through NIR and the intraspecific showed the chemical changes that can occur in the same species from different habitats. All the mollusks that passed through the equipment, survived. The analysis of the shells through NIR showed interspecific variation in relation to *Biomphalaria* species. Furthermore, it was possible to separate infected from non-infected animals with 82.5% accuracy. In conclusion, this work ratified the NIRS technique as an innovative tool in the field of medical Malacology, both in the separation of species and in the detection of infected specimens, which is relevant mainly for studies on the epidemiology of schistosomiasis transmission.

**Palavras-chave:** Schistosomiasis, *Biomphalaria*, spectrophotometer, species differentiation, parasitological diagnosis.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 Gênero <i>Biomphalaria</i> e as espécies transmissoras da esquistossomose mansoni no Brasil .....	13
1.1.1- Diferenciação morfológica .....	13
1.1.2- Composição química das conchas .....	17
1.1.3- Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> em espécies de <i>Biomphalaria</i> .....	19
1.2 Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo como instrumento de análise do fenótipo químico .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.2 Objetivo geral .....	28
3.3 Objetivos específicos .....	28
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
4.1 Moluscos e populações de estudo .....	28
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com espectrofotômetro dispersivo de raio X (EDS) .....	30
4.3 Espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIR) .....	32
4.3.1 Diferenciação das espécies .....	33
4.3.2 Diagnóstico parasitológico .....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1 Análise ultraestrutural das conchas das três espécies de <i>Biomphalaria</i> .....	38
5.1.1 <i>Biomphalaria glabrata</i> Say, 1818 .....	38
5.1.2 <i>Biomphalaria tenagophila</i> (d'Orbigny, 1835) .....	39
5.1.3 <i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848) .....	40
5.2 Elementos químicos presentes em diferentes sítios nas conchas de <i>Biomphalaria</i> spp .....	45
5.2.1 Oxigênio (O) .....	50
5.2.2 Cálcio (Ca) .....	50
5.2.3 Nitrogênio (N) .....	53
5.2.4 Ferro (Fe) .....	53
5.2.5 Fósforo (P) .....	55
5.2.6 Silício (Si) .....	56
5.2.7 Flúor (F) .....	57
5.3 Protocolo de análise espectral de infravermelho próximo de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> , hospedeiros intermediários de <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil .....	57
5.4 Modelo espectrofotométrico de classificação de <i>Biomphalaria</i> spp .....	60
5.4.1 Espécimes vivos .....	60
5.4.2 Conchas .....	65
5.5 Modelo espectrofotométrico de classificação de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	67
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>77</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Filo Mollusca é um dos maiores e mais diversos filios do Reino Animal. Estima-se que existam cerca de 100.000 espécies descritas na fauna atual e mais 35.000 espécies que já se extinguíram, o que demonstra a enorme importância e diversidade do filo (Simone, 1999). Toda essa diversidade está distribuída nos mais variados habitats, em ambiente marinho de variadas profundidades, água doce e terrestre (Brusca; Brusca, 2007).

Esse filo tem uma extensa história geológica, tendo sido encontrado um rico vestígio fóssil desde o Período Cambriano. Muitas conchas de moluscos fazem parte de jazigos arqueológicos, os sambaquis, e são utilizadas em estudos paleontológicos de reconstrução de ambientes aquáticos, de análise do comportamento do homem antigo e de pesquisas de prospecção climática (Andrus, 2011). Além disso, os moluscos têm um papel significativo em diversas áreas como: religião, mitologia, artesanato, arquitetura, literatura, ecologia e economia (Ronecker, 1997; Moraes; Bravim, 1998; Nomura, 2000; Alves *et al.*, 2002; Lima, 2015).

A importância de algumas espécies de moluscos também tem sido estudada em tratamentos zoterápicos e clínico-farmacológicos. Baseados em práticas e crenças médicas tradicionais que vêm passando de geração a geração ao longo do tempo (Costa Neto, 2006). Pesquisadores têm evidenciado o uso de princípios ativos de algumas espécies de moluscos no tratamento de diversas enfermidades, como a capacidade antiviral do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé, 1976 frente ao vírus do sarampo e da Influenza (Toledo-Piza *et al.*, 2016; 2018) e da citotoxicidade *in vitro* contra certos tipos de células cancerígenas de peptídeos encontrados no muco de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (E-kobon *et al.*, 2015).

Por ser um grupo bastante diversificado, apresenta um alto grau de complexidade e não possui uma forma padrão quanto à sua aparência externa. De um modo geral, os moluscos apresentam simetria bilateral, um corpo mole não segmentado e composto pela cabeça, um pé ventral musculoso e as vísceras. Nas vísceras contêm órgãos internos que acomodam a cavidade do manto de onde, na maior parte desses animais, é secretada uma concha calcária (Brusca; Brusca, 2007).

Tradicionalmente o filo Mollusca é dividido em sete classes, sendo a classe Gastropoda a de maior importância médica, veterinária e econômica. Nesta classe estão incluídas espécies que são consideradas pragas agrícolas, moluscos utilizados na culinária francesa (*escargot*) e hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos e de alguns nematóides (Simone, 2007; MS, 2008).

## **1.1 Gênero *Biomphalaria* e as espécies transmissoras da esquistossomose mansoni no Brasil**

### **1.1.1- Diferenciação morfológica**

Encontradas em regiões tropicais e subtropicais, as espécies do gênero *Biomphalaria* estão classificadas no filo Mollusca, classe Gastropoda, sub-classe Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae.

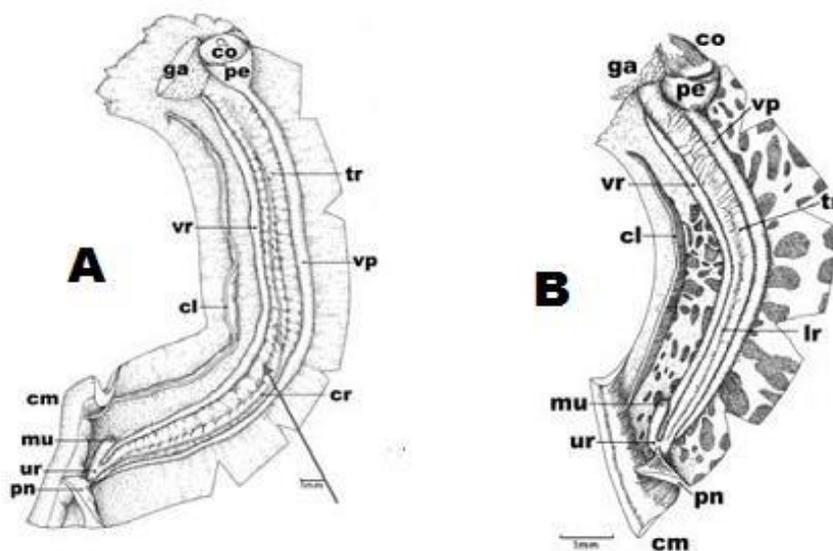
Como os demais planorbídeos, esse gênero apresenta uma concha achatada e em forma de disco, com um padrão planispiral que varia de diâmetro no indivíduo adulto de 7 mm, em *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), até 40 mm no caso da *B. glabrata*. A cor natural da concha é o castanho, mas isso pode variar, dependendo de substâncias dissolvidas na água do criadouro, do marrom ao negro (MS, 2008).

Não possuem brânquias e assimilam o oxigênio com o auxílio de uma pseudobrânquia e um saco pulmonar virtual, sendo a circulação hemolinfática e com a presença de hemoglobina na hemolinfa (Paraense, 1975). Possuem um par de tentáculos na parte superior da cabeça com os olhos localizando-se na base dos mesmos e apresentam o tubo renal em forma de J. São hermafroditas, e a reprodução pode ocorrer por autofecundação ou fecundação cruzada, sendo o último tipo a mais utilizada, por garantir a manutenção da variabilidade genética (Paraense, 1976).

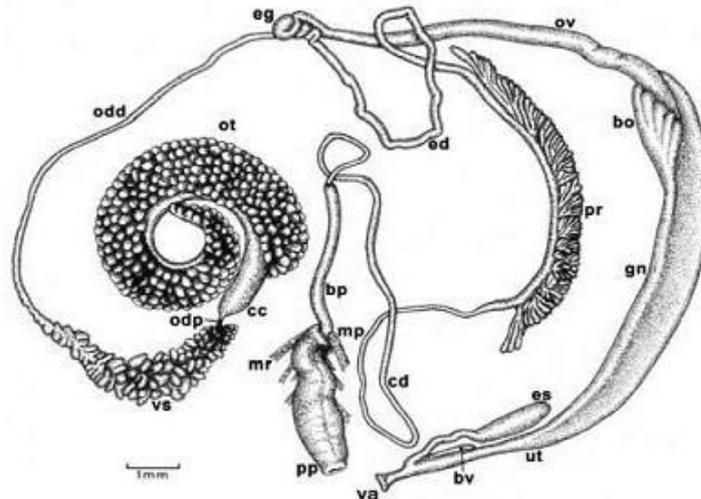
Das espécies já descritas do gênero, três delas têm um papel fundamental no ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no Brasil, pois foram encontradas naturalmente infectadas por este parasito, sendo elas: *Biomphalaria glabrata* Say, 1818; *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). Essas espécies apresentam

características morfológicas distintas e as conchas podem ser usadas na diferenciação entre elas, porém também são necessárias a dissecção e a caracterização de algumas estruturas do aparelho reprodutor e excretor para o diagnóstico taxonômico.

A concha de um exemplar adulto de *B. glabrata* é considerada a maior do gênero medindo em média 11 mm de altura e diâmetro entre 20 mm e 30 mm, podendo chegar até 40 mm, em ambientes mais favoráveis. Apresenta cerca de 6 giros arredondados que crescem lentamente em diâmetro, sutura bem marcada em ambos os lados e abertura oval ou arredondada (Paraense, 1961, 2008). Anatomicamente, essa espécie caracteriza-se por apresentar uma crista renal ao longo da superfície ventral do tubo renal na fase adulta (figura 1A) e uma linha pigmentada ao longo do tubo renal na fase jovem (figura 1B), caráter que não é observado nas demais espécies do gênero. Possuem bolsa vaginal e a porção média da bainha do pênis tem aproximadamente o mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente (Paraense, 1972, 1975, 2008) (figura 2).



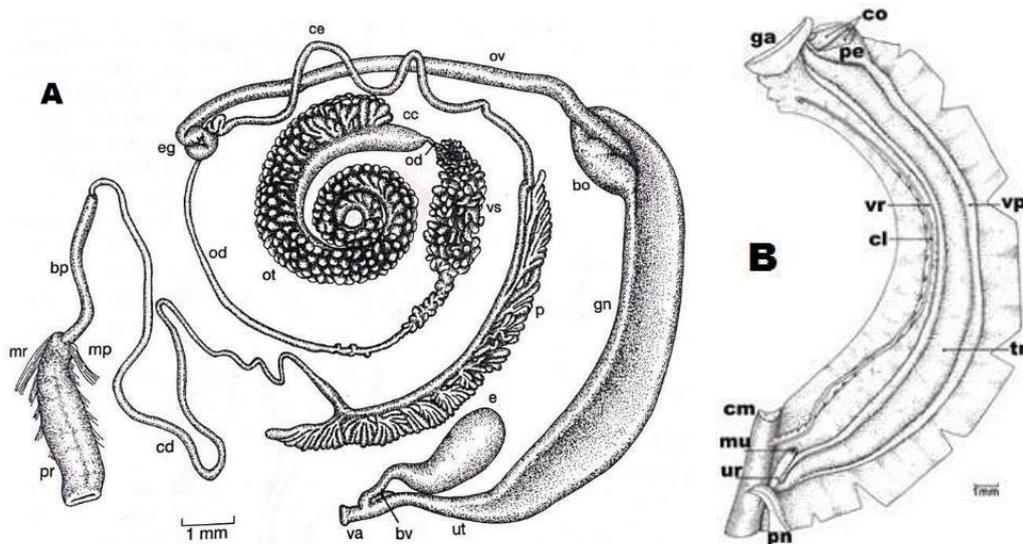
**Figura 1.** (A) Manto de um exemplar adulto de *Biomphalaria glabrata*, onde se vê a crista renal (seta); (B) manto de um exemplar jovem com a linha renal pigmentada. Coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), crista renal (cr), linha renal pigmentada (lr), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn). Fonte: M.S., 2008.



**Figura 2.** Sistema reprodutor de *Biomphalaria glabrata*. Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (**cc**), encruzilhada genital (**eg**), ovispermídito proximal (**odp**), ovispermídito distal (**odd**), ovoteste (**ot**) e vesícula seminal (**vs**); estruturas masculinas: bainha do pênis (**bp**), canal deferente (**cd**), espermiduto (**ed**), músculos do complexo peniano [retrator (**mr**) e protrator (**mp**)], prepúcio (**pp**) e próstata (**pr**); estruturas femininas: bolsa do oviduto (**bo**), bolsa vaginal (**bv**), espermateca (**es**), glândula nidamental (**gn**), oviduto (**ov**), vagina (**va**) e útero (**ut**). Fonte: M.S., 2008.

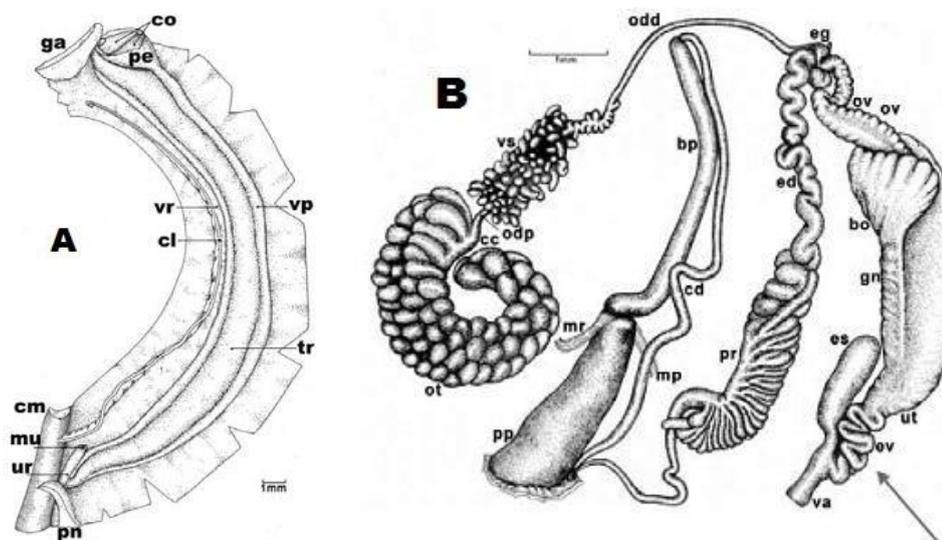
*Biomphalaria tenagophila*, quando adulta, apresenta concha com 11 mm de altura na abertura, podendo alcançar cerca de 25 mm de diâmetro na maioria das populações. Possuem de sete a oito giros com carena dos dois lados da concha, sendo mais acentuada à esquerda; sutura bem marcada dos dois lados; abertura deltoide.

A morfologia interna é praticamente idêntica à de *B. glabrata* (figura 3A), sendo diferenciadas apenas pela ausência da crista renal ou da linha pigmentada (figura 3B) em *B. tenagophila*.



**Figura 3. (A)** Sistema reprodutor de *Biomphalaria tenagophila*. Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (**cc**), encruzilhada genital (**eg**), ovispermiduto proximal (**odp**), ovispermiduto distal (**odd**), ovoteste (**ot**) e vesícula seminal (**vs**); estruturas masculinas: bainha do pênis (**bp**), canal deferente (**cd**), espermiduto (**ed**), músculos do complexo peniano [retrator (**mr**) e protrator (**mp**)], prepúcio (**pp**) e próstata (**pr**); estruturas femininas: bolsa do oviduto (**bo**), bolsa vaginal (**bv**), espermateca (**es**), glândula nidamental (**gn**), oviduto (**ov**), vagina (**va**) e útero (**ut**). Fonte: PARAENSE, 2008. **(B)** Manto de um exemplar de *B. tenagophila* sem a presença de crista renal. Coração (**co**), pericárdio (**pe**), glândula de albúmen (**ga**), veia pulmonar (**vp**), veia renal (**vr**), tubo renal (**tr**), crista lateral (**cl**), colar do manto (**cm**), ureter (**ur**), meato do ureter (**mu**) e pneumóstoma (**pn**). Fonte: M.S., 2008.

*Biomphalaria straminea* é a menor espécie dentre as três hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, pois sua concha alcança cerca de 16 mm de diâmetro e 6 mm de altura na abertura, com 5 giros arredondados ou ovóides, crescendo mais rapidamente em diâmetro e sutura bem marcada em ambos os lados, geralmente mais profunda à esquerda (Paraense, 2008). Diferentemente de *B. glabrata*, essa espécie não possui a crista renal ou linha pigmentada nos exemplares jovens (figura 4A), mas apresenta um enrugamento na parede dorsal esquerda da vagina, como característica anatômica diferencial (Paraense, 2008) (figura 4B).



**Figura 4. (A)** Manto de um exemplar de *B. straminea* sem a presença de crista renal. Coração (co), pericárdio (pe), glândula de albúmen (ga), veia pulmonar (vp), veia renal (vr), tubo renal (tr), crista lateral (cl), colar do manto (cm), ureter (ur), meato do ureter (mu) e pneumóstoma (pn). **(B)** Sistema reprodutor de *B. straminea* destacando o enrugamento vaginal (seta). Sistema reprodutor: canal coletor do ovoteste (cc), encruzilhada genital (eg), ovispermiduto proximal (odp), ovispermiduto distal (odd), ovoteste (ot) e vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: bainha do pênis (bp), canal deferente (cd), espermiduto (ed), músculos do complexo peniano [retrator (mr) e protrator (mp)], prepúcio (pp) e próstata (pr); estruturas femininas: bolsa do oviduto (bo), enrugamento vaginal (ev), espermateca (es), glândula nidamental (gn), oviduto (ov), vagina (va) e útero (ut). Fonte: M.S., 2008.

### 1.1.2- Composição química das conchas

A concha é considerada a característica marcante de muitos moluscos, indo além das funções de proteção contra predadores e suporte para os órgãos internos (Furuhashi *et al.*, 2009). Essas são compostas por carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), em mais de 90% de sua massa, e de matrizes orgânicas. De forma geral, elas são formadas por três camadas: a mais externa, chamada de perióstraco, que inclui a matriz orgânica; a intermediária é a camada prismática, formada por cristais de calcita, aragonita e/ou vaterita e a interna, chamada de camada nacarada que em algumas situações pode apresentar reflexos coloridos, chamados de madrepérola (Nudelman *et al.*, 2006). As matrizes orgânicas são compostas de lipídios, proteínas, como a conchiolina que forma o perióstraco, e polissacarídeos como a quitina. Segundo estudos anteriores, essas substâncias conferem um papel chave na regulação do desenvolvimento,

crescimento, morfologia e orientação dos cristais de aragonita/calcita/vaterita no processo de calcificação (Suzuki; Nagazawa, 2013).

Torna-se cada vez mais importante conhecer a formação e composição das conchas e, também, as possíveis alterações das mesmas em consequência de mudanças ambientais. A partir disso, os estudos envolvidos no processo de biomineralização da concha tem contribuído para o desenvolvimento de materiais biomiméticos (Paula; Silveira, 2009; Meldrum, 2003).

Devido à composição química, estrutural e resistência, as conchas dos moluscos vêm sendo comparadas aos ossos dos vertebrados, sendo biomateriais que compartilham importantes propriedades mecânicas. Nos dois casos apresenta-se uma interação entre os componentes biológicos e minerais. Ambos apresentam em sua matriz orgânica constituída de glicoproteínas, proteoglicanos, dentre outros que participam com a matriz inorgânica do processo de calcificação (Marxen; Becker, 1997; Hoshi *et al.*, 2001). Além dessas semelhanças entre os ossos nos vertebrados e as conchas nos invertebrados, ambos são tecidos biológicos com um processo de cristalização mediado por uma matriz macromolecular. Westbroek e Marin (1998) observaram *in vivo* a formação de osteoblastos, devido à interação entre o nácar retirado de um molusco bivalve e o osso de um paciente. O revestimento nacarado utilizado foi bioativo, biodegradável e resistente à propagação das trincas, além de não induzir processo inflamatório.

Estudos sobre o processo de biomineralização são escassos na literatura, sendo mais frequentes na classe Bivalvia, devido à importância econômica na indústria alimentícia e na formação de pérolas. A formação de calcita/aragonita como principal estrutura da matriz inorgânica das conchas, a partir de carbonato de cálcio amorfo tem sido estudada em diferentes classes de moluscos. No entanto, o primeiro relato deste mecanismo de formação da concha foi descrito por Hasse *et al.* (2000) no planorbídeo *B. glabrata*, espécie mais frequentemente utilizada em estudos bioquímicos.

Na concha de um exemplar adulto de *B. glabrata* a quantidade de matriz orgânica corresponde a aproximadamente 0,9% do peso seco da concha em comparação com a parte inorgânica. A aragonita é o principal componente inorgânico encontrado. Este desenvolvimento e composição é controlado pela

matriz orgânica constituída por estruturas poliméricas de proteína e carboidratos (Marxen; Becker, 1997; Marxen *et al.*, 1998). Apesar da aragonita ser encontrada em exemplares adultos de *B. glabrata*, vaterita, precursora da aragonita, foi observada na região do umbigo, área central mais antiga da concha. Supõe-se que a concentração de vaterita varia conforme a idade do animal. A vaterita está relacionada a formação embrionária da concha e no processo de reparo a danos mecânicos da mesma. Esta hipótese é suportada pela presença de vaterita acumulada na camada abaixo do perióstraco (Hasse *et al.*, 2000). A relação vaterita/aragonita nas conchas de moluscos é pouco estudada.

A principal proteína da matriz orgânica já descrita em *B. glabrata* foi identificada como uma dermatopontina. Uma característica da dermatopontina presente na concha de *B. glabrata* foi a ocorrência de uma única sequência de N-glicosilação, em que a aspargina foi completamente modificada com um pentassacarídeo (Marxen *et al.*, 2003). Em 2016, Pila *et al.* descreveram a ocorrência de dermatopontina 2 como uma das proteínas expressas em hemócitos de *B. glabrata*. Foi a primeira vez que se associou esta proteína com sistema imune de defesa e compatibilidade ao *S. mansoni*. É exatamente o reconhecimento do sistema imune que permite o desenvolvimento do ciclo de *S. mansoni* no molusco.

### 1.1.3- Infecção por *Schistosoma mansoni* em espécies de *Biomphalaria*

A esquistossomose mansoni é uma doença parasitária que vem afetando populações humanas de diferentes regiões no mundo (Rey, 2008) e tem como agente etiológico a espécie *S. mansoni*. No Brasil, considerado o maior país das Américas em áreas de transmissão (Coura; Amaral, 2004), mais de 105 mil pessoas foram acometidas por essa doença nos períodos de 2013 até 2017, segundo o DataSUS. Devido ao alto número de pessoas infectadas ou sob risco de infecção por residirem em áreas endêmicas, essa parasitose é considerada um problema de saúde pública e uma doença perpetuadora da pobreza, pois

está associada à precária condição de saneamento básico e a debilidade física dos doentes, impossibilitando para o trabalho, o que agrava sua situação econômica (Hotez *et al.*, 2008; Katz; Peixoto, 2000).

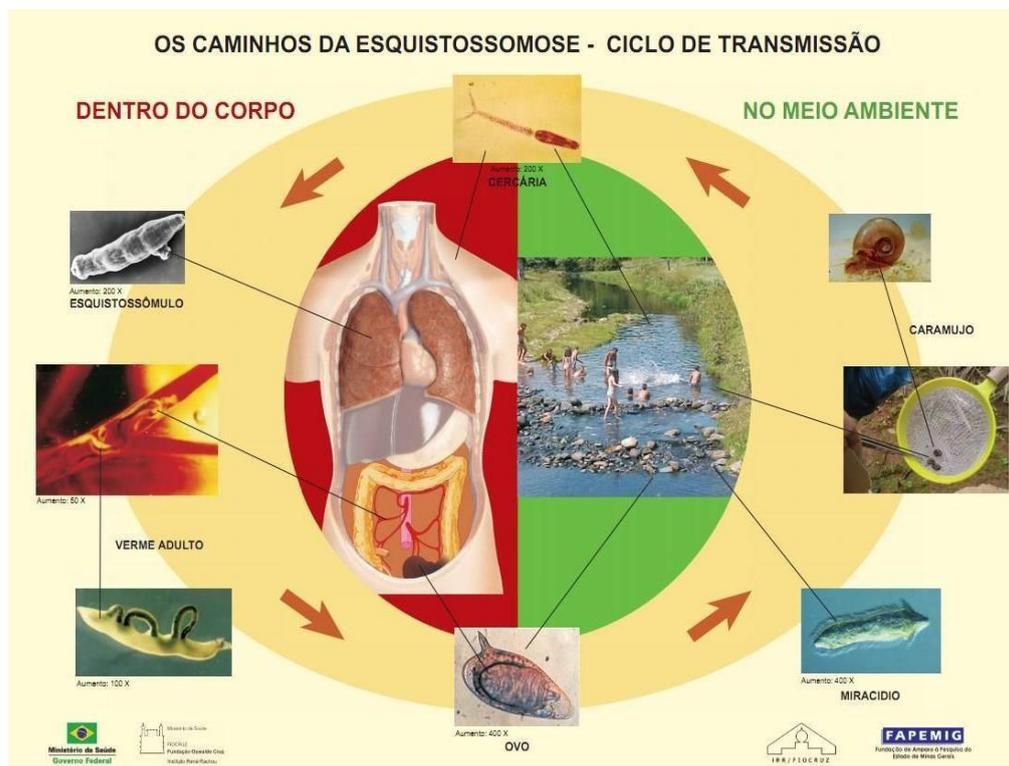
Nos moluscos do gênero *Biomphalaria* desenvolve-se o ciclo assexuado do parasito, por poliembrionia. Uma única forma larval, o miracídio, pode dar origem a centenas de cercárias, forma infectante para o hospedeiro definitivo (Thiengo, 2007). O ciclo de vida de *S. mansoni* pode ser observado na figura 5. Quando os ovos embrionados presentes nas fezes de hospedeiros definitivos infectados entram em contato com a água, a larva miracídio eclode. Esta larva é coberta por placas epidérmicas ciliadas, possui glândulas de adesão e penetração, *terebratorium*, reserva de glicogênio para nadar até encontrar o molusco suscetível e células germinativas que darão origem as cercárias. O molusco libera substâncias como a mucina, que estimulam, aceleram e direcionam os movimentos dos miracídios em sua direção, reduzindo as perdas energéticas e propiciando o desenvolvimento do ciclo de vida (Despommier *et al.*, 2005). Os miracídios nadam em direção à superfície até encontrar o molusco compatível e penetrar através do tegumento. Esse processo deve ocorrer nas primeiras horas de vida, já que após 6 horas ele se torna inativo.

No interior do molusco, o miracídio perde sua superfície ciliada, as estruturas de penetração e a musculatura definham. Após oito dias se transformam em um tubo enovelado, sem movimento e com muitas células germinativas, sendo então chamado de esporocisto primário (Machado-Silva *et al.*, 2008). Os esporocistos migram para a glândula digestiva do molusco e aumentam de tamanho, chegando a 250 µm de comprimento. Por conta da diferenciação das células em cercárias, são chamados de esporocistos secundários (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). Na glândula digestiva, os esporocistos banhados pela hemolinfa, adquirem reserva energética (glicose) e arginina para a diferenciação das células (Pinheiro, 2007). Esta transformação ocorre em torno de 28 a 35 dias. Podem ocorrer várias gerações de esporocistos secundários, que mantêm a eliminação de cercárias pelo hospedeiro intermediário.

As cercárias são eliminadas na água pelo molusco, movimentando-se com reserva energética de até 12 horas para infectar o hospedeiro definitivo vertebrado (Souza; Lima, 1990). Medem cerca de 0,5 cm de comprimento e são

divididas em duas partes: corpo e cauda. O corpo possui 0,2 mm de comprimento por 0,07 mm de diâmetro e é recoberto por numerosos microespinhos, possui duas ventosas, uma oral localizada na parte anterior e outra ventral na região posterior. A cauda mede cerca de 0,32 mm de comprimento e possui uma bifurcação no extremo distal. As furcas na cercária de *S. mansoni* são menores que o corpo da mesma (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). A transformação de cercárias para esquistossômulos ocorre logo após a penetração das cercárias no hospedeiro mamífero. Os esquistossômulos sofrem intensas modificações ultraestruturais e fisiológicas desde as primeiras horas após a infecção, com a perda do glicocálix, conversão do tegumento trilaminar em heptalaminar e mudança do metabolismo energético de aeróbico para anaeróbico (Machado-Silva *et al.*, 2008). Em torno de 60 dias, encontram-se ovos embrionados nas fezes dos hospedeiros definitivos.

Assim, como possuem morfologia diferenciadora, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* têm características distintas frente à manutenção do ciclo do parasito. A espécie *B. glabrata* possui distribuição mais litorânea e geralmente sua distribuição está associada a ocorrência de esquistossomose. Isso pelo fato dela apresentar as linhagens mais suscetíveis a infecção por *S. mansoni*, mantendo a eliminação de cercárias por longos períodos. Esta espécie apresenta a sua distribuição sempre associada a ocorrência de esquistossomose no Brasil (Souza; Lima, 1990). *B. tenagophila* tem uma distribuição mais limitada a regiões do sudeste e sul do Brasil, tendo se adaptado a temperaturas mais baixas. São responsáveis pela transmissão em muitas cidades destes estados (Bezerra, 2004). Já *B. straminea* é a espécie mais bem-sucedida e adaptada às variações climáticas, sendo encontrada em todas as regiões do Brasil (MS, 2008). É menos suscetível a infecção que *B. glabrata*, sendo responsável pela manutenção das taxas de infecção nas populações do Nordeste Brasileiro (MS, 2014).



**Figura 5:** Esquema representando o ciclo de transmissão da esquistossomose, evidenciando os hospedeiros definitivos (mamífero) e intermediário (caramujo *Biomphalaria*) e as principais fases de *Schistosoma mansoni*. Fonte: SCHALL, 2007

A relação entre o parasito *S. mansoni* e seus hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* vai além das características básicas de afinidade e abrange complexos mecanismos moleculares do sistema interno de defesa do próprio caramujo. Nas primeiras horas de infecção o parasito incorpora no tegumento proteínas e carboidratos semelhantes aos encontrados nas membranas das células de defesa, levando o sistema imune dos moluscos a reconhecer o esporocisto como *self*. Este mecanismo se assemelha ao mecanismo de mimetismo antigênico desenvolvido pelo esquistossômulo no hospedeiro definitivo (Wu *et al.*, 2009; Guillou *et al.*, 2007). Paralelamente, o desenvolvimento do ciclo do parasito no molusco provoca alterações proteicas, metabólicas e imunológicas como uma reação ao parasitismo (Mendes *et al.*, 2019). Devido a coevolução dessas espécies, esse processo de reconhecimento entre *S. mansoni* e *Biomphalaria* sp. tem um caráter que abrange diversos fatores, envolvendo diferentes carboidratos e glicoproteínas do parasito e receptores

imunológicos do hospedeiro (Mone *et al.*, 2010), além da interferência do ambiente.

Assim que ocorre o reconhecimento do parasito, hemócitos, principalmente dos tipos granulócitos e hialinócitos, passam a atuar incisivamente no sistema de defesa interno do caramujo associado a fatores solúveis (Coustau *et al.*, 2015; Gianelli *et al.*, 2016). Mesmo nas primeiras 24h de infecção já é possível identificar um aumento significativo no número de hemócitos circulantes na hemolinfa do molusco (Mendes *et al.*, 2019).

A relação parasito-hospedeiro também desencadeia alterações fisiológicas importantes no molusco hospedeiro intermediário (Pinheiro, 2007). Faro *et al.* (2013) identificaram uma diminuição na disposição de glicose na hemolinfa e aumento na mobilização de carboidratos durante a infecção, o que mostra a maior necessidade energética do caramujo quando infectado. O molusco tende a compensar essa diminuição de glicogênio usando as reservas energéticas presentes na glândula digestiva e na região cefalopediosa e alterando seu metabolismo de carboidratos através do aumento da atividade catalítica de gliconeogênese (Mello-Silva *et al.*, 2010).

Compreender a interação *Biomphalaria* - *S. mansoni* nos diferentes ambientes, onde ocorre a transmissão do parasito é uma ação necessária ao desenvolvimento de estratégias de controle alternativas, impedindo a transmissão pelo hospedeiro intermediário. Cabe ressaltar que estas estratégias de controle não devem promover contaminações ambientais e sim serem ecológicas e eficientes.

Identificar no campo se os moluscos estão infectados, sem precisar levar ao laboratório, na maioria das vezes, longe do local de coleta, ainda não é possível, mas é um problema a ser estudado e resolvido. Esta possibilidade pode mudar e agilizar a aplicação de medidas de controle da transmissão mais efetivas. A espectroscopia vibracional de infravermelho próximo tem sido utilizada para o diagnóstico de parasitos de outros invertebrados como mosquitos, mas ainda não tinha sido testada para moluscos.

## 1.2 Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo como instrumento de análise do fenótipo químico

A espectroscopia de infravermelho próximo é considerada uma técnica simples para aquisição de espectros em que obtém dados qualitativos e quantitativos dos constituintes químicos da biomassa dos diferentes seres vivos por meio da interação da radiação eletromagnética com a amostra. Com potencial de aquisição de 50 espectros por minuto, essa técnica não necessita de tratamento prévio da amostra, não é invasiva e nem destrutiva, além de não gerar resíduos, o que a coloca em uma posição privilegiada, por ser uma técnica de diagnóstico inovadora e ecologicamente correta. No entanto, para uma análise destes espectros, é necessária a aplicação de métodos quimiométricos, que incluem: pré-tratamento espectral, classificação dos espectros, calibração para produção de modelos e validação dos mesmos.

A análise qualitativa classifica as amostras de acordo com os espectros apresentados na NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*) e essas identificações são baseadas em métodos de reconhecimento de padrões, o que favorece a aplicação dessa metodologia em áreas como a química, biologia e ciências de alimentos. O desenvolvimento do modelo quantitativo pode ser considerado necessário, a partir do momento em que, após a classificação das amostras, seja útil saber mais precisamente em que extensão as amostras são diferentes (Roggo *et al.*, 2007).

Cada ligação covalente que absorve a faixa do infravermelho há uma frequência natural de vibração. Estas vibrações são diferentes quando as ligações covalentes estão em diferentes compostos e estes em ambientes diversos. Em consequência, o espectro infravermelho de duas moléculas de estruturas diferentes não será idêntico. Este espectro é utilizado como uma impressão digital química da molécula, análoga a impressão digital dos seres humanos. Desta forma, segundo Pavia *et al.* (2010) e Pasquini (2018), uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação, possibilitando a análise das vibrações fundamentais, quantificadas na faixa do infravermelho médio. Na faixa do infravermelho próximo é possível analisar apenas os sobretons e as bandas de combinação das vibrações das moléculas em ligação. Sobretons são bandas de absorção com valores de frequência aproximadamente correspondentes

a múltiplos inteiros daqueles das vibrações normais ou fundamentais. São sinais vibracionais observados de 10 a 100 vezes menores do que os observados nas vibrações fundamentais. As bandas de combinação são combinações lineares das frequências normais ou múltiplos inteiros dessas (Luz, 2003), ocorrendo quando duas frequências vibracionais se juntam em uma molécula e dão origem a uma nova vibração com frequência diferente das ligações sozinhas. Logo, a frequência da radiação eletromagnética associada a absorção de uma combinação é igual a soma das frequências das duas vibrações que interagem entre si (Pavia *et al.*, 2010). Devido a este fato, os espectros observados por meio espectrofotômetro de infravermelho próximo correspondem a um perfil químico da amostra, resultante da combinação de todas as ligações covalentes existentes na mesma, chamada atualmente de fenótipo químico.

NIRS é uma ferramenta de análise exploratória que já é amplamente utilizada em diferentes áreas como: astronomia, indústria petrolífera e alimentícia, meio ambiente (ar, água e solo), controle de qualidade ambiental, na produção de fármacos, ecologia, taxonomia biológica, medicina, dentre outros (Santos *et al.*, 2010; Brown; Doole; Malfait, 2011; Li *et al.*, 2011; Ji-Youg *et al.*, 2012). As utilidades e aplicações do NIR vêm sendo ampliadas, principalmente, nas indústrias de produção com o controle de qualidade da água e do petróleo, na identificação de polímeros, na análise e diferenciação de materiais têxteis, entre outros. Na agricultura e na indústria alimentícia, tem sido uma ferramenta importante durante décadas, em que se analisa desde a umidade, proteína, gordura, amido, açúcares e fibras de grãos e alimentos processados até o quanto algumas carnes estão frescas e saudáveis para consumo. Na indústria farmacêutica é utilizada no controle de qualidade de produtos farmacêuticos quanto a sua composição, pureza e originalidade (Ciurczak, 2006). Além disso, mais recentemente começou a ser uma ferramenta utilizada na área biológica, com pesquisas que envolvem diversas áreas de estudo da biodiversidade: ecologia, taxonomia, bioquímica e parasitologia (Sikulu *et al.*, 2014; Sikulu-Lord *et al.*, 2016; 2018; Fernandes *et al.*, 2018). Aplicações práticas no auxílio do diagnóstico das espécies se constitui como mais uma fonte que pode contribuir para a classificação das espécies, a taxonomia química (Depickere; Ravelo-García; Lardeux, 2020), relacionando-se aos dados químicos obtidos da biomassa dos seres vivos, se associando a taxonomia clássica e a taxonomia molecular.

Ao estudarem o carbonato de cálcio nas conchas de moluscos aquáticos, observando os espectros de calcita e aragonita presentes, Louisfert e Pobbequin (1952) (*apud* Compere Jr; Bates, 1972) foram os primeiros autores a aplicarem a espectroscopia de infravermelho (*Infrared Spectroscopy* – IRS) em moluscos. Apesar dessa mesma técnica ter sido usada posteriormente por Compere Jr e Bates (1972), e esses autores relatarem que esta metodologia poderia ser utilizada como rotina para identificação da composição das conchas dos moluscos, somente no final do século XX que os trabalhos aplicando o IRS no estudo desse grupo de animais se intensificaram.

A IRS aplicada em moluscos vem sendo usada principalmente na faixa do infravermelho médio, buscando entender o processo de formação das conchas dos moluscos (biomineralização) e seus marcadores (Dauphin; Denis, 2000; Dauphin *et al.*, 2008; Petrone *et al.*, 2008; Furuhashi *et al.*, 2009; Paula; Silveira, 2009; Brown, 2011; Gaume *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2012), identificação da matriz orgânica das conchas (Marxen *et al.*, 1998) e identificação de quitina em conchas de sítios arqueológicos (Wysokowski *et al.*, 2014)

Na distinção das espécies de moluscos, a técnica de infravermelho tem sido aplicada usando o muco produzido pelos moluscos no processo de locomoção. Este muco apresenta na sua composição lectinas, glicoproteínas, mucopolissacarídeos, dentre outros compostos que se apresentam de formas diferentes nas espécies. Skingsley *et al.* (2000) relataram a diferenciação, através do muco, de espécies de lesmas e de caracóis usando esta técnica, sendo eles, *Arion ater var. rufus* (L.), *Arion subfuscus* (Draparnaud, 1805), *Arion hortensis* (Férussac, 1819), *Deroceras reticulatum* (Muller, 1774), *Limax maculatus* (Kaleniczenko, 1851 (atualmente *Limacus maculatus*), *Helix aspersa* L. (atualmente *Cornu aspersum*) e *Cepaea nemoralis* (L.). Em 2008, Lim e Tan, através da mesma técnica, identificaram mais oito espécies de moluscos terrestres, para isso, foi necessária a presença bem conservada do molusco.

Trabalhos envolvendo a técnica NIRS e gastrópodes límnicos de importância médica e veterinária não tinham sido realizados até 2015 (Mello-Silva *et al.* 2015), sendo o nosso o primeiro grupo a padronizar e iniciar o uso dessa técnica, mais especificamente, em espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil.

## 2 JUSTIFICATIVA

A distinção das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* com exatidão geralmente é feita por um taxonomista especialista através de caracteres morfológicos, porém, em alguns casos, não é possível identificar com precisão, sendo necessário recorrer ao estudo genético, através de técnicas específicas que geralmente são destrutivas. Taxonomistas têm se tornado cada vez mais escassos atualmente o que acaba dificultando a diferenciação e, no caso dos fósseis, ou de exemplares depositados há muito tempo em coleções científicas, acaba sendo ainda mais complicado, onde, geralmente, não se tem as estruturas internas do animal preservadas. Por isso, técnicas mais modernas como microscopia eletrônica e espectroscopia que facilitem a identificação das espécies sem danificar o espécime são estimuladas (Nudelmann, 2015).

Estudos aprofundados sobre as conchas das três espécies de *Biomphalaria*, transmissores da esquistossomose no Brasil e sua composição são escassos. Considerando que as conchas são um reflexo das projeções metabólicas do animal, as três espécies apresentam características biológicas e fisiológicas distintas entre si, possivelmente o arranjo químico e proteico nas matrizes das conchas desses animais apresenta-se de forma diferente. Além disso, não se tem na literatura uma caracterização ultraestrutural das conchas dessas espécies através do microscópio eletrônico de varredura.

Ressalta-se que a diferenciação das espécies de *Biomphalaria* hospedeiras de *S. mansoni* no Brasil é imprescindível para a aplicação de medidas preventivas e ao controle da esquistossomose, pois cada espécie apresenta caráter epidemiológico diferente na transmissão da mesma. Neste contexto, é notória a importância de se conhecer a composição química e estrutural das conchas dessas espécies, para que com o uso de técnicas mais modernas seja possível diferenciá-las de uma forma mais rápida e menos destrutiva.

Mello-Silva *et al.* (2015) estudaram a possibilidade de identificação das três espécies de *Biomphalaria* transmissoras da esquistossomose no Brasil, através da espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR), utilizando apenas as conchas destas espécies mantidas em ambiente controlado. É um método

simples para aquisição de espectros, não necessita de tratamento prévio da amostra, não é invasivo e nem destrutivo, além de não gerar resíduos, o que o coloca em uma posição privilegiada, pois é uma técnica de diagnóstico inovadora e ecologicamente correta. No entanto, há necessidade de validar este estudo com outras populações mantidas em laboratório e de campo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.2 Objetivo geral

Diferenciar as três espécies hospedeiras intermediárias de *Schistosoma mansoni* no Brasil, provenientes de populações de laboratório e de campo, bem como detectar a infecção deste parasito em *Biomphalaria glabrata*, com base em dados espectrofotométricos, químicos e/ou ultraestruturais.

#### 3.3 Objetivos específicos

- Caracterizar ultraestruturalmente as conchas de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*;
- Analisar as diferenças de elementos químicos interespecíficos e intraespecíficos em conchas de populações de laboratório e de campo;
- Construir e validar um modelo quimiométrico de classificação interespecífica e intraespecífica, baseada em dados espectrofotométricos de infravermelho próximo;
- Diferenciar o fenótipo químico de *B. glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* daquele de exemplares não-infectados.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Moluscos e populações de estudo

Para o presente estudo foram analisados um total de 598 espécimes das três espécies de moluscos hospedeiros naturais de *S. mansoni* no Brasil, sendo 150 deles coletados em campo e os demais provenientes do moluscário do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose – Malacologia (LRNEM). Cada

espécie estudada apresenta espécimes de 3 populações criadas em laboratório e 1 população coletada recentemente do campo. As populações das espécies utilizadas neste estudo, criadas em laboratório e coletadas em campo, estão demonstradas na tabela 1:

Tabela 1: Número de espécimes de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e de *B. straminea* analisados por espécie e população.

Espécie	População	Número de amostras	
		Vivos	Conchas
<i>B. glabrata</i>	Belo Horizonte/ MG	150	-----
	Sumidouro/ RJ	50	-----
	Sumidouro/ RJ (CAMPO)	50	50
	Jacobina/ BA	44	26
<i>B. tenagophila</i>	Taim/ RS	20	-----
	Jacarepaguá (bairro do município do RJ)/ RJ	42	-----
	Jacarepaguá (bairro do município do RJ) / RJ (CAMPO)	50	43
	Itamaraju/ BA	43	20
<i>B. straminea</i>	Tangará/ RN	20	-----
	Paracambi/ RJ	29	-----
	Paracambi/ RJ (CAMPO)	50	50
	Jaboticatubas/ MG	50	41

As populações de espécies criadas em laboratório foram escolhidas baseadas nos modelos estudados anteriormente por Mello-Silva (2015) e linhagens provenientes de áreas de transmissão de *S. mansoni* mantidas no LRNEM. A escolha das populações coletadas em campo está pautada nos estudos de distribuição de moluscos límnicos no estado do Rio de Janeiro realizado por Thiengo *et al.* (2001, 2002). As coletas de moluscos e das águas dos criadouros foram realizadas nas datas e localizações uma única vez, conforme descrito na tabela 2:

Tabela 2: Datas e pontos de coleta de *Biomphalaria glabrata*, *B. tengophila* e de *B. straminea*, com coordenadas geográficas.

Data	Local	Coordenadas geográficas (GPS)
30/05/2019	Sumidouro/RJ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 22° 2' 14.60" S 42° 39' 42.11" O</li> <li>• 22° 1' 52.11" S 42° 38' 37.91" O</li> <li>• 22° 1' 55.62" S 42° 39' 14.85" O</li> </ul>
24/06/2019	Jacarepaguá/RJ	22° 54' 56" S 43° 25' 56" O
08/07/2019	Paracambi/RJ	22° 35' 56" S 43° 42' 56" O

Todos os moluscos usados neste trabalho foram mantidos em aquários, devidamente separados por espécie e população, sob as mesmas condições de temperatura, sendo alimentados com alface previamente lavados e em livre demanda. Além disso, as análises foram realizadas com espécimes após a maturidade sexual (laboratório e campo) de 8 a 12 mm de diâmetro, variando conforme a espécie.

Os animais coletados em campo foram mantidos no laboratório, na mesma água em que foram encontrados, até o fim das análises. O Laboratório de Malacologia, na pessoa da Dra Silvana Thiengo, possui licença permanente para coleta de material zoológico (moluscos), licença SISBIO 14551-1 com data de emissão 09/12/2008. Todos os moluscos coletados foram expostos à luz semanalmente durante 30 dias para verificação de possível infecção natural conforme descrito em MS (2008). Nenhum molusco recém coletado no campo foi considerado positivo (infectado) para trematódeos pois não apresentaram eliminação de nenhum tipo de cercária no teste de exposição à luz (MS, 2008)

#### **4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com espectrofotômetro dispersivo de raio X (EDS)**

A caracterização ultraestrutural e química das conchas das três espécies de *Biomphalaria* foi realizada no microscópio eletrônico de varredura com EDS (energy dispersive X- Ray spectroscopy), de marca e modelo Jeol JSM 6390, através da Plataforma FIOCRUZ de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth.

Para esse estudo foram utilizadas 10 conchas de cada uma das três espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil, totalizando 30

conchas, sendo metade delas (15 conchas, 5 de cada espécie) de populações coletadas recentemente no campo e as demais de populações criadas em laboratório. As populações utilizadas nessas análises, sendo o primeiro local de laboratório e o segundo de campo, foram: *B. glabrata* – Jacobina (BA) e Sumidouro (RJ), *B. tenagophila* – Itamaraju (BA) e Jacarepaguá (RJ) e *B. straminea* – Jaboticatubas (MG) e Paracambi (RJ).

As amostras foram fixadas com fita de carbono dupla-face em suportes de alumínio medindo 9 mm de diâmetro e 11 mm de altura, denominados “stubs”, com o lado esquerdo da concha voltado para cima. Após esse procedimento as conchas foram cobertas por carbono para que pudessem ser posteriormente analisadas pelo equipamento.

Para a caracterização ultraestrutural das conchas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* provenientes do laboratório e do campo foram realizadas imagens de varredura do total da concha, da região central (umbigo) e da última volta.

Para a caracterização e comparação dos elementos químicos presentes nas conchas das três espécies de *Biomphalaria* das populações de laboratório e de campo foi necessário o uso de um espectrofotômetro dispersivo de raio-X (EDS), da marca Thermo Scientific, acoplado ao MEV. Esse acessório permite realizar análises semi-quantitativas dos elementos químicos presentes em uma região selecionada da amostra.

Foram selecionados 3 pontos na camada superficial da concha, o perióstraco, e 3 pontos em áreas que demonstravam um desgaste na concha, possivelmente a camada abaixo do perióstraco, a prismática, onde estão localizados os cristais de cálcio. Logo, foram escolhidos 6 pontos no umbigo e 6 pontos na última volta da concha.

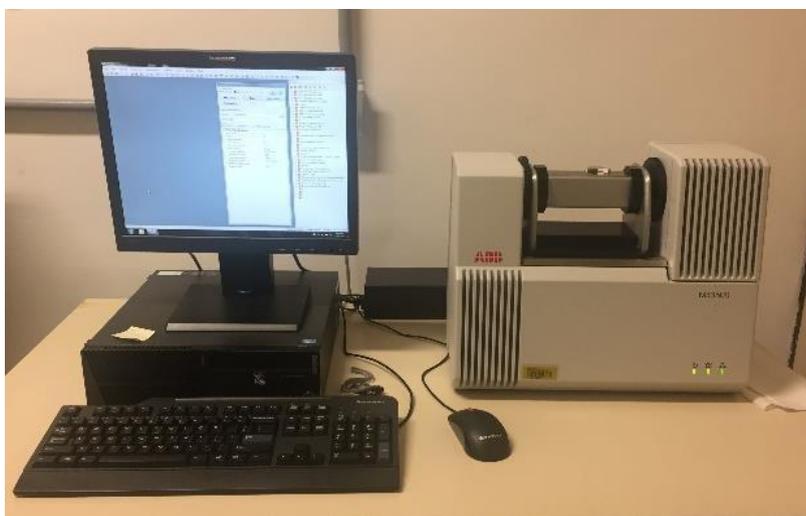
Os resultados foram expressos em porcentagem de peso para cada elemento químico identificado (wt%). Os resultados oriundos do MEV/EDS foram plotados em um banco de dados Microsoft ACCESS (versão 365 Pro Plus) e analisados no software R versão 4.0.2 (R Core Team, 2020). Para avaliar as diferenças entre as espécies estudadas (*B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*), o local de origem das espécies (campo e laboratório) e a matriz (orgânica e inorgânica) em relação a concentração dos elementos químicos

encontrados, foi realizado o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, com nível de significância  $\alpha=5\%$ .

### 4.3 Espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIR)

As análises espectrais dos espécimes vivos e das conchas das três espécies de *Biomphalaria* foram realizadas através do equipamento de espectrofotômetro de infravermelho próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) da marca e modelo ABB Boomem MB 3600 (figura 6), que se encontra no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental/IOC/Fiocruz.

Como rotina de uso é realizado, semanalmente, uma validação do equipamento, a fim de avaliar as suas condições de funcionamento. Essa validação é feita utilizando como branco para o equipamento, um frasco de vidro contendo spectralon em pó, como recomendado pelo fabricante. O padrão de referência espectroscópico para todas as análises é o mesmo vidro com spectralon. Ressalta-se que a referência é obtida antes de cada grupo de amostras, que são analisadas randomicamente.



**Figura 6:** Espectrofotômetro de Infravermelho Próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) da marca e modelo ABB Boomem MB 3600 e o computador de uso exclusivo do equipamento.

Para todas as análises realizadas no FT-NIR foram obtidos 50 espectros de cada amostra de concha ou animal vivo com resolução de  $16\text{ cm}^{-1}$  e o ganho foi ajustado conforme a amostra.

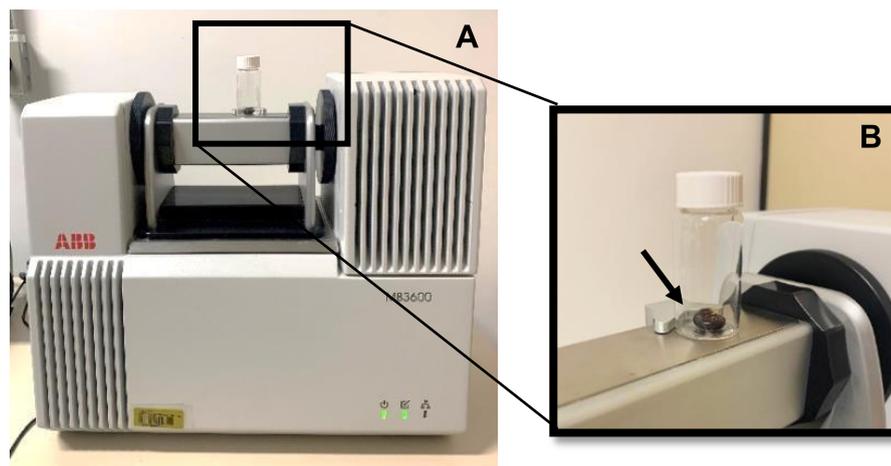
Após a obtenção dos espectros, são necessários métodos quimiométricos que foram realizados através do software Unscrambler®, onde os espectros brutos foram pré-processados, utilizando técnicas de alisamento Savitzky-Golay (janela de 31 pontos e polinômio de 2ª ordem) e a 1ª derivada Savitzky-Golay (janela de 15 pontos e polinômio de 2ª ordem), para que pudessem reduzir possíveis variações referentes a ruídos e provenientes de fontes não informativas, que poderiam influenciar nos resultados finais. Além disso, foi necessária a criação de um modelo espectral para cada conjunto de amostras analisadas para que, posteriormente, fosse realizada a validação do mesmo.

Para observar a existência de grupos entre as amostras das diferentes espécies foi realizada uma análise exploratória de dados utilizando a Análise de Componentes Principais (PCA). Após o agrupamento, aplicou-se a Análise Discriminante Linear (LDA) como método de classificação. Através da tabela de classificação originada do LDA, foi realizada a taxa de classificação de acertos (%) que é definida pelo número total de acertos vezes 100 e dividida pela quantidade de amostras utilizadas na validação.

#### 4.3.1 Diferenciação das espécies

Através do NIR foram obtidos espectros de 598 moluscos vivos, não infectados, e de 230 conchas de populações variadas das três espécies de *Biomphalaria* estudadas. Os animais foram retirados dos aquários e colocados em placas de Petri devidamente identificadas até a hora da análise no FT-NIR.

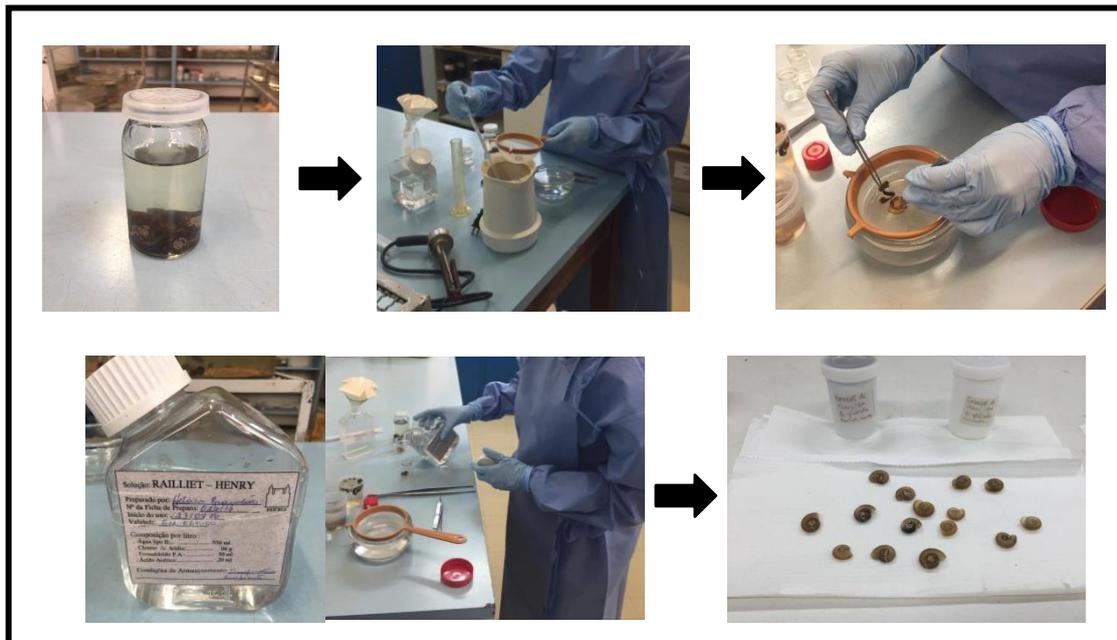
Para a análise dos moluscos vivos, a concha de cada espécime foi seca superficialmente com papel absorvente para a retirada da água em excesso, posicionada dentro do frasco de vidro com o lado esquerdo da concha voltado para baixo e, assim, disposto diretamente na janela do equipamento (figura 7). Após a obtenção dos espectros, os animais foram colocados em novos aquários, separados por população e espécie.



**Figura 7:** (A) FT-NIR com Powder Sampler. (B) Frasco de vidro com um espécime vivo de *Biomphalaria glabrata* (seta) pronto para ser medido no FT-NIR através da janela do equipamento.

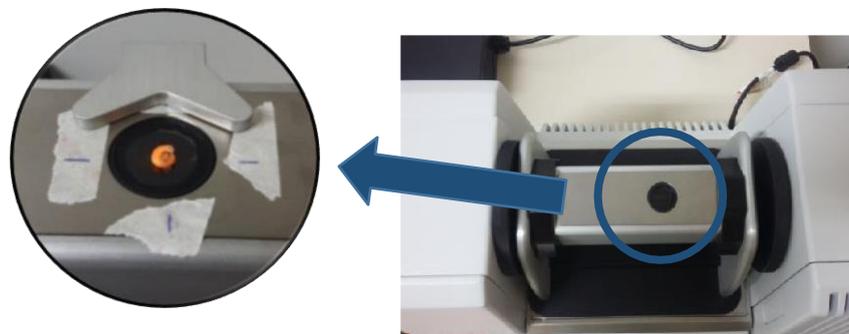
Para a análise exclusivamente das conchas de *Biomphalaria* spp. de diferentes populações foi necessário, primeiramente, separar a massa visceral da concha do animal. Para isso, os espécimes foram anestesiados com hypnol, onde ficaram submersos por cerca de 6h, até estarem com a musculatura relaxada. Após esse processo, os moluscos foram imersos em água a 70° C durante 30 a 45 segundos, de acordo com o tamanho do exemplar. Logo em seguida, foram colocados em água fria. Com o auxílio de uma pinça e segurando a concha submersa em um frasco de água com uma das mãos, o pé do molusco foi puxado suavemente, retirando a parte mole (MS, 2008).

As conchas recém-separadas foram mantidas em água para retirar qualquer resíduo de tecido que possa ficar retido na concha e, então, foram colocadas sobre papel absorvente e deixadas secando durante 15 dias em temperatura ambiente de 26° C  $\pm$  1° C. A parte mole do animal foi fixada em solução modificada de Railliet-Henry para animais de água doce e posteriormente dissecada com o objetivo de confirmar a identificação das espécies analisadas (MS, 2008) (figura 8).



**Figura 8:** Procedimento para a separação da concha da parte mole dos moluscos.

Posteriormente ao processo de secagem da concha, cada amostra foi posicionada individualmente na janela do equipamento para a obtenção do espectro (figura 9).



**Figura 9:** Detalhe da janela do NIR e no detalhe com seta, a posição da concha na janela de emissão do NIR com o lado sinistro voltado para baixo.

Tanto os espécimes vivos quanto as amostras de conchas foram selecionadas para a análise de forma randômica, o que favorece a homogeneidade e confiabilidade da coleta de dados. Além disso, ressalta-se que a referência é obtida a cada grupo de amostras.

#### 4.3.2 Diagnóstico parasitológico

A análise parasitológica de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* foi realizada utilizando 150 espécimes vivos da população de Belo Horizonte/MG, onde 100 animais foram infectados e os demais 50 não foram infectados e, assim, considerados grupo controle.

O processo de infecção de *B. glabrata* por *S. mansoni* linhagem Belo Horizonte/MG, simpátrica à espécie de moluscos, foi realizada de duas formas diferentes, seguindo os procedimentos operacionais padrão do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – LAPSA (CEUA L016/2015): infecção individual de 50 moluscos em placa de 24 poços com 8 a 10 miracídios e infecção em massa de 50 moluscos em placa de Petri com uma média de  $7 \pm 2$  por molusco. Logo, as fezes do roedor infectado foram recolhidas e passaram pelo processo de sedimentação para a obtenção dos ovos do parasito. O sedimento resultante, contendo os ovos, foi exposto à luz para a eclosão dos miracídios, forma infectante para espécies de *Biomphalaria*. Todos os moluscos foram mantidos individualmente em recipientes de vidro, devidamente identificados e numerados.

Após o período de 30 dias de infecção, os animais foram separados em dois grupos para a posterior identificação de cercárias: grupo 1- pré-triagem, composto pelos moluscos expostos à infecção em massa e que foram analisados no FT-NIR antes da eliminação de cercárias e grupo 2 - pós-triagem, composto pelos moluscos expostos à infecção individual e que foram analisados no equipamento após a eliminação de cercárias e comprovação da eficácia da infecção. O processo denominado triagem ocorreu através da exposição de cada caramujo, individualmente, em frascos de vidro de 5 mL, à luz artificial durante 1 hora (Figura 10). Através desse procedimento, que se repetiu até a 8ª semana de infecção, foi possível identificar a eliminação de cercárias pelo caramujo na água. Foram obtidos 77 espécimes considerados positivos, 27 no grupo pré-triagem e 50 no grupo pós-triagem. As cercárias destes animais positivos foram contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio, onde foi coletado 0,1 mL da água com cercária que estava no frasco de vidro e posicionado em uma lâmina com Lugol, esse procedimento repetiu-se 3 vezes para que fosse feita uma média. Posteriormente foram analisados estatisticamente a relação entre a quantidade de cercárias eliminadas pelos

moluscos e a taxa de classificação de acertos obtidas através dos dados do FT-NIR (tabela 3).



**Figura 10:** Exposição dos caramujos infectados a luz artificial para verificar a eliminação de cercárias.

Os moluscos foram numerados e submetidos ao FT-NIR de forma randômica seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para animais vivos. Foram utilizados dois frascos de vidro, um para os animais não expostos ao parasito (controle) e outro para os animais expostos, sendo eles positivos ou não. Os animais do grupo pré-triagem foram analisados no equipamento sempre 4 horas antes do procedimento de triagem, já o grupo pós-triagem, sempre 4 horas depois da triagem. Após as análises no FT-NIR, os animais permaneceram em recipientes de vidro individualizados para uma possível relação entre a quantidade de cercárias e os espectros obtidos.

A metodologia de diagnóstico parasitológico foi adaptada de Fluckiger et al. (2011) para moluscos vivos e dos experimentos com mosquitos infectados com a bactéria *Wolbachia* sp. (Sikulu-Lord et al., 2016).

Tabela 3: Quantidade de cercárias eliminadas por cada um dos espécimes de *Biomphalaria glabrata* positivos para *Schistosoma mansoni*.

Nº do molusco	Qnt. de cercárias	Nº do molusco	Qnt. de cercárias	Nº do molusco	Qnt. de cercárias
1	200	27	450	53	1666
2	130	28	16	54	50
3	180	29	116	55	1766
4	630	30	133	56	150
5	650	31	566	57	116
6	15	32	1380	58	166
7	315	33	1545	59	83
8	50	34	2430	60	916
9	1915	35	675	61	2950
10	715	36	480	62	66
11	200	37	1350	63	50
12	165	38	2745	64	866
13	150	39	1695	65	283
14	530	40	2709	66	66
15	80	41	754	67	166
16	150	42	135	68	200
17	150	43	50	69	1350
18	530	44	130	70	300
19	133	45	2230	71	616
20	266	46	3650	72	933
21	16	47	4165	73	700
22	300	48	1115	74	250
23	50	49	3680	75	483
24	183	50	1450	76	516
25	83	51	83	77	33
26	50	52	550		

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise ultraestrutural das conchas das três espécies de *Biomphalaria*

#### 5.1.1 *Biomphalaria glabrata* Say, 1818

As conchas dos exemplares de *B. glabrata* foram as maiores dentre as três espécies analisadas, com uma média de, aproximadamente, 11 mm de diâmetro

e 5 giros completos. Através da imagem obtida pelo aparelho de microscopia eletrônica de varredura é possível notar um caráter mais plano na concha dessa espécie e uma angulação entre as suturas, com um crescimento progressivo no decorrer dos giros. Esse crescimento progressivo, também observado nas conchas da população de campo, apresenta um caráter mais irregular, quando comparado a concha de laboratório (figura 11A), evidenciado a partir do 3º giro da concha conforme pode ser observado na figura 11D.

Os depósitos de cálcio (pontos esbranquiçados) mais concentrados nas últimas voltas, principalmente, da concha de laboratório (figura 11C) também podem ser observados, assim como, um maior depósito de matéria orgânica nas conchas de campo (figura 11F). Quanto às marcas, que demonstram danos causados ao perióstraco expondo a camada prismática, (figura 14A e 14B), foram mais observadas no umbigo das conchas de *B. glabrata* de laboratório (figura 11B), porém os espécimes de campo apresentaram danos por toda a concha, como buracos, má formação da concha e riscos profundos e bem marcados no decorrer das linhas de crescimento.

É possível observar suturas menos profundas e linhas de crescimento suaves. No destaque da região mais desgastada do umbigo da população de laboratório, além da exposição da camada prismática da concha, é possível observar os cristais de cálcio dispostos verticalmente (Figura 14A).

#### 5.1.2 *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835)

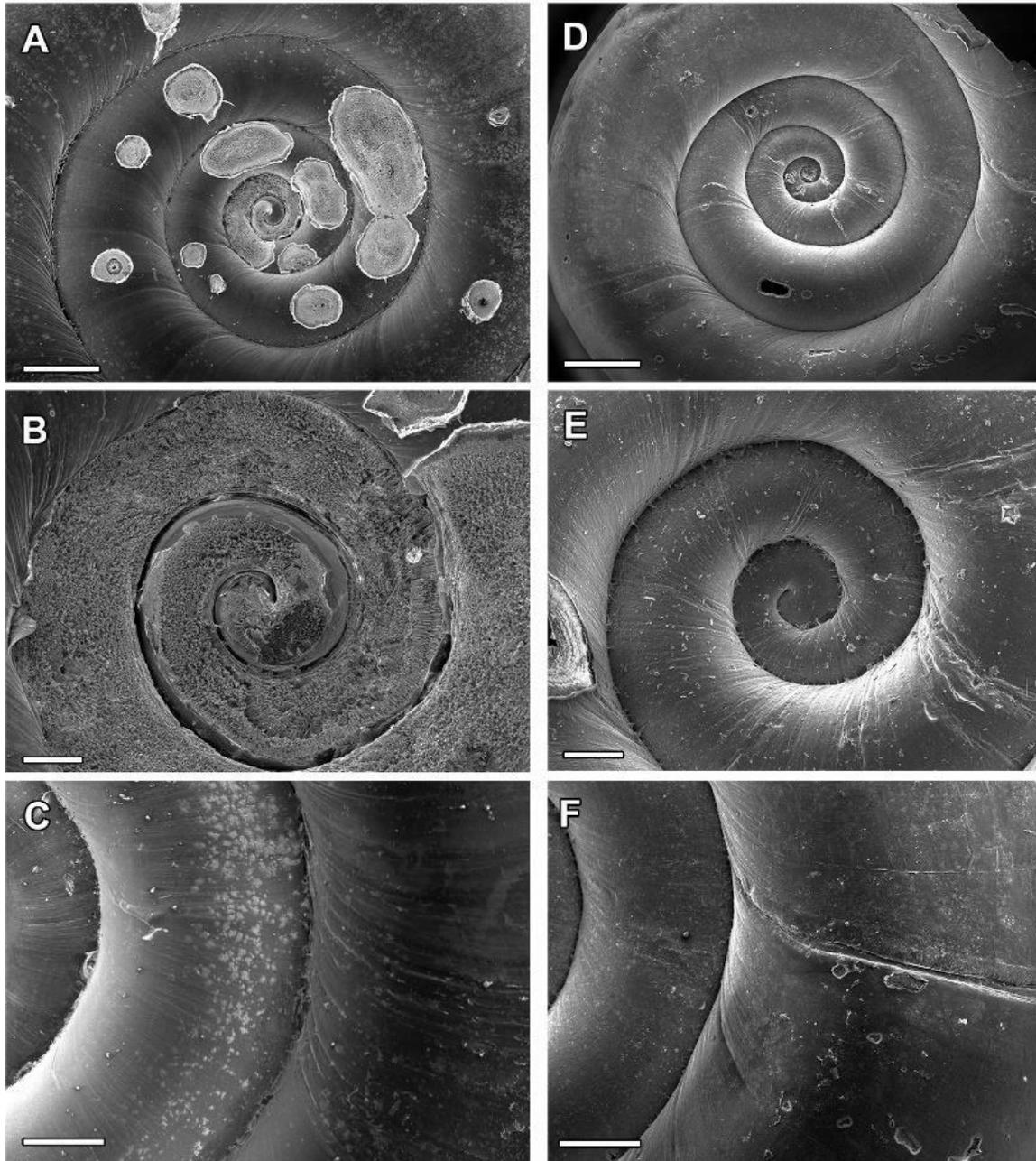
As conchas de *B. tenagophila* apresentaram um tamanho médio de 9 mm e todas elas com 4,5 giros. Através da imagem obtida no MEV pode-se observar um significativo aumento na angulação de todas as conchas de *B. tenagophila* (figuras 12A e 12D), entre as suturas, a partir da terceira/quarta volta, deixando aparente a carena (angulação longitudinal na lateral da concha) bem característica da espécie (figuras 12C e 12F). É possível notar as marcas de desgaste com exposição da outra camada da concha no sentido das linhas de crescimento da população de laboratório. Também se observa um desgaste na região do umbigo das duas populações (figuras 12B e 12E). No destaque da região da última volta, pode-se observar linhas de crescimento mais marcantes do que outras e a angulação bem marcada da carena (figuras 12C e 12F). Em relação a região desgastada do umbigo, nota-se a exposição da camada

prismática da concha, sendo que a disposição dos cristais é diferente de *B. glabrata*. Em *B. tenagophila* os cristais de cálcio parecem estar dispostos de forma longitudinal (figura 12B).

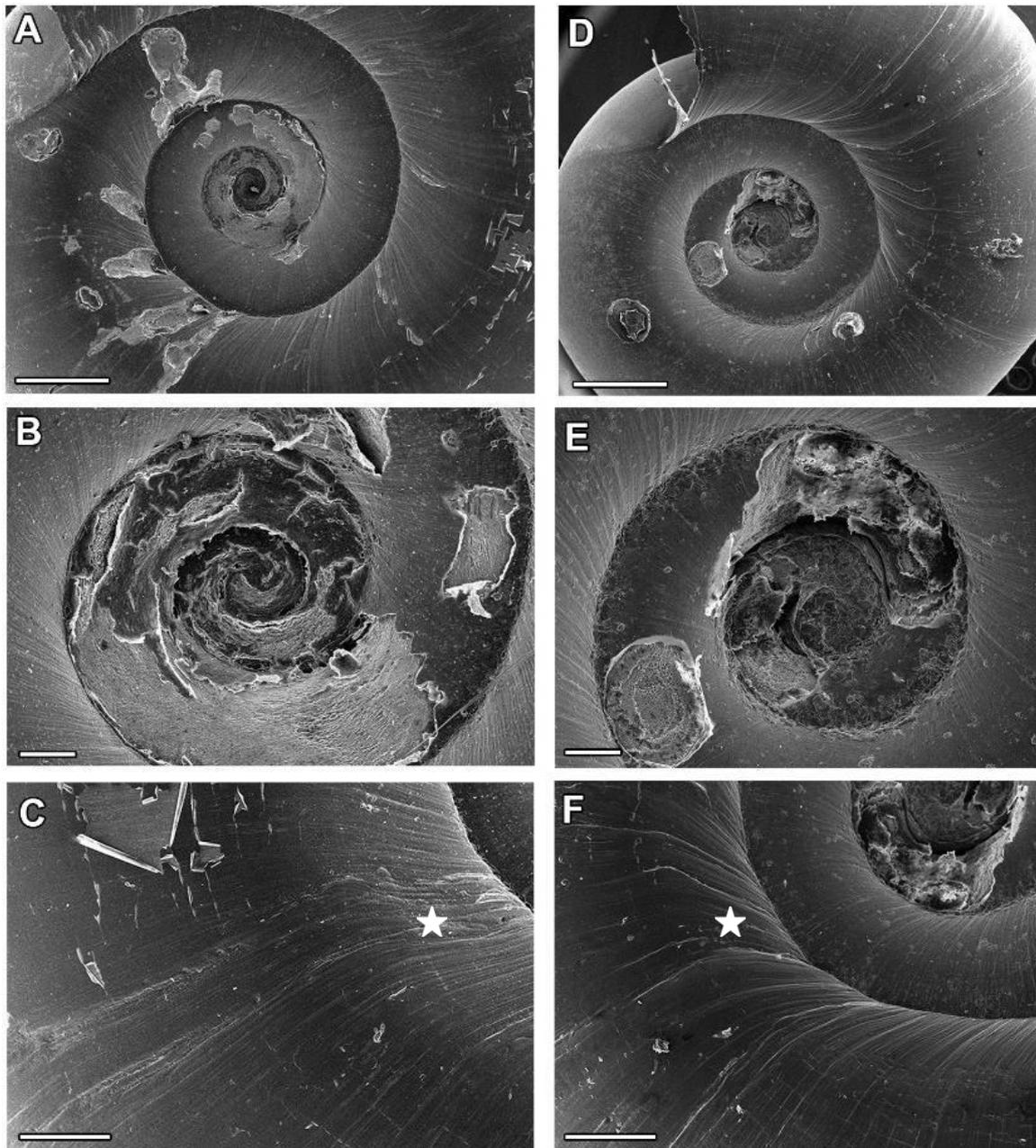
As conchas de campo, assim como aquelas de *B. glabrata*, apresentam maior depósito de matéria orgânica, porém, no caso de *B. tenagophila* esse material aparenta estar em maior quantidade e mais concentrado próximo as suturas (figura 12E).

### 5.1.3 *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848)

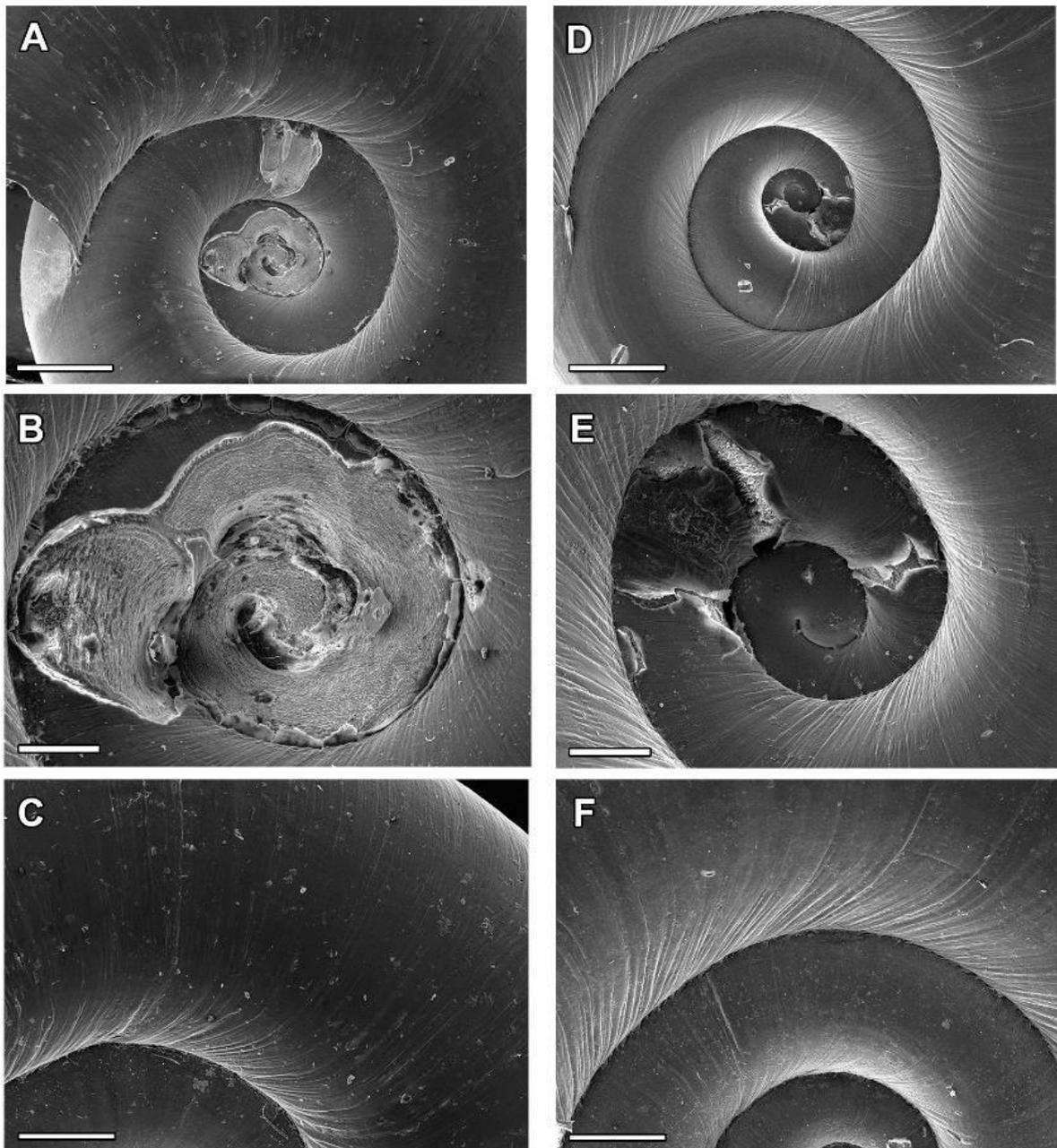
As conchas de *B. straminea* foram as menores dentre as três espécies hospedeiras utilizadas, com um diâmetro médio de 5,5 mm e, aproximadamente, 3 voltas e meia. Pelas imagens obtidas no MEV é possível notar a profundidade existente em direção ao umbigo. Tanto na população de laboratório quanto na de campo a concha apresenta um rápido aumento de diâmetro entre a 2ª e 3ª volta com uma angulação à esquerda. Apresenta uma linha de crescimento bem demarcada, ressaltando esta diferença de diâmetro entre as voltas da concha (figuras 13A e 13D) sendo melhor observada na concha da população de campo. A última volta é a maior em diâmetro em relação às demais, possuem linhas de crescimento mais acentuadas próximas a região da sutura (figuras 13C e 13F). Apresentam também pontos esbranquiçados relacionados ao depósito de carbonato de cálcio, principalmente na população de laboratório, mas também podendo ser observada na população de campo. Marcas de desgaste podem ser vistas nas regiões do umbigo e, raramente ou nenhuma, na última volta. A figura 13B e 13E mostram a região desgastada da concha de *B. straminea* e pode-se observar que os cristais de cálcio na camada prismática estão dispostos da mesma forma que em *B. tenagophila*. Com o evidente desgaste mais acentuado no umbigo, a figura 14C evidencia as três camadas de uma concha de *B. straminea* da população de campo, onde é possível observar a camada mais externa, perióstraco, a intermediária, prismática e a mais interna, a nacarada, que apresenta um aspecto mais perolado.



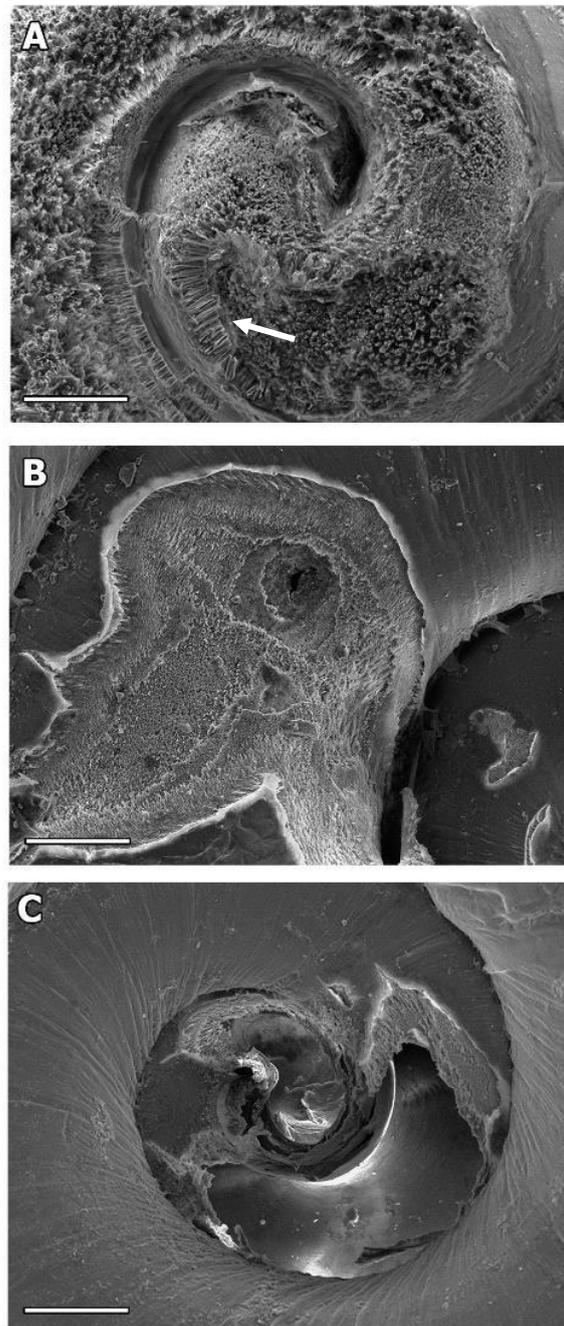
**Figura 11:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria glabrata*. **(A)** Imagem total da população de laboratório (1 mm. x17); **(B)** área desgastada do umbigo da população de laboratório (200  $\mu$ m. x65); **(C)** imagem das últimas voltas da população de laboratório (500  $\mu$ m. x37); **(D)** Imagem total da população de campo (1 mm. x17); **(E)** área desgastada do umbigo da população de campo (200  $\mu$ m. x65); **(F)** imagem das últimas voltas da população de campo (500  $\mu$ m. x37).



**Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria tenagophila*. **(A)** Imagem total da população de laboratório (1 mm. x20); **(B)** área desgastada do umbigo da população de laboratório (200  $\mu$ m. x65); **(C)** imagem das últimas voltas da população de laboratório evidenciando a carena (estrela) (500  $\mu$ m. x43); **(D)** Imagem total da população de campo (1 mm. x20); **(E)** área desgastada do umbigo da população de campo (200  $\mu$ m. x65); **(F)** imagem das últimas voltas da população de campo evidenciando a carena (estrela) (500  $\mu$ m. x43).



**Figura 13:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria straminea*. **(A)** Imagem total da população de laboratório (500  $\mu\text{m}$ . x33); **(B)** área desgastada do umbigo da população de laboratório (100  $\mu\text{m}$ . x120); **(C)** imagem das últimas voltas da população de laboratório (500  $\mu\text{m}$ . x43); **(D)** Imagem total da população de campo (500  $\mu\text{m}$ . x33); **(E)** área desgastada do umbigo da população de campo (100  $\mu\text{m}$ . x120); **(F)** imagem das últimas voltas da população de campo (500  $\mu\text{m}$ . x43).



**Figura 14:** Microscopia eletrônica de varredura de conchas de *Biomphalaria* spp. para evidenciar as camadas da concha (100  $\mu\text{m}$ . x220). **(A)** Imagem dos cristais de cálcio expostos (seta) de *Biomphalaria glabrata* população de laboratório; **(B)** área desgastada da concha de *Biomphalaria glabrata* população de campo com a exposição da camada prismática; **(C)** área desgastada do umbigo de *Biomphalaria straminea* população de campo evidenciando a camada nacarada.

## 5.2 Elementos químicos presentes em diferentes sítios nas conchas de *Biomphalaria* spp.

Foram encontrados, através do MEV-EDS, nas conchas das três espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil (laboratório e campo) um total de 15 elementos químicos, sendo eles: C (carbono), O (oxigênio), Ca (cálcio), N (nitrogênio), Fe (ferro), Al (alumínio), F (flúor), S (enxofre), Cl (cloro), Na (sódio), Mg (magnésio), Si (silício), P (fósforo), Mn (manganês) e Mo (molibdênio). Sendo, os 6 primeiros elementos citados (C, O, Ca, N, Fe e Al) encontrados em todos os 30 exemplares analisados.

Nas tabelas 4, 5 e 6 estão apresentados os dados semi-quantitativos (%) de todos os elementos químicos encontrados nas conchas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, respectivamente. É possível observar a média dos elementos das regiões com e sem perióstraco (matrizes orgânica e inorgânica, respectivamente) do umbigo e da última volta das conchas do grupo coletado em campo e criado em laboratório. As conchas de *B. straminea*, tanto a população de campo quanto a de laboratório, não apresentaram pontos de matriz inorgânica na última volta da mesma.

A partir dos resultados obtidos, foi possível comparar, de forma geral, os elementos químicos encontrados nas conchas de laboratório e de campo. Comparando os 6 elementos que foram encontrados em todas as conchas desses dois grupos, o ferro foi o metal pesado encontrado em maior quantidade nas conchas de campo do que em laboratório. Além disso, através da figura 15 é possível notar a disponibilidade desses elementos nas conchas, sendo o carbono, cálcio e oxigênio os primordiais para sua formação.

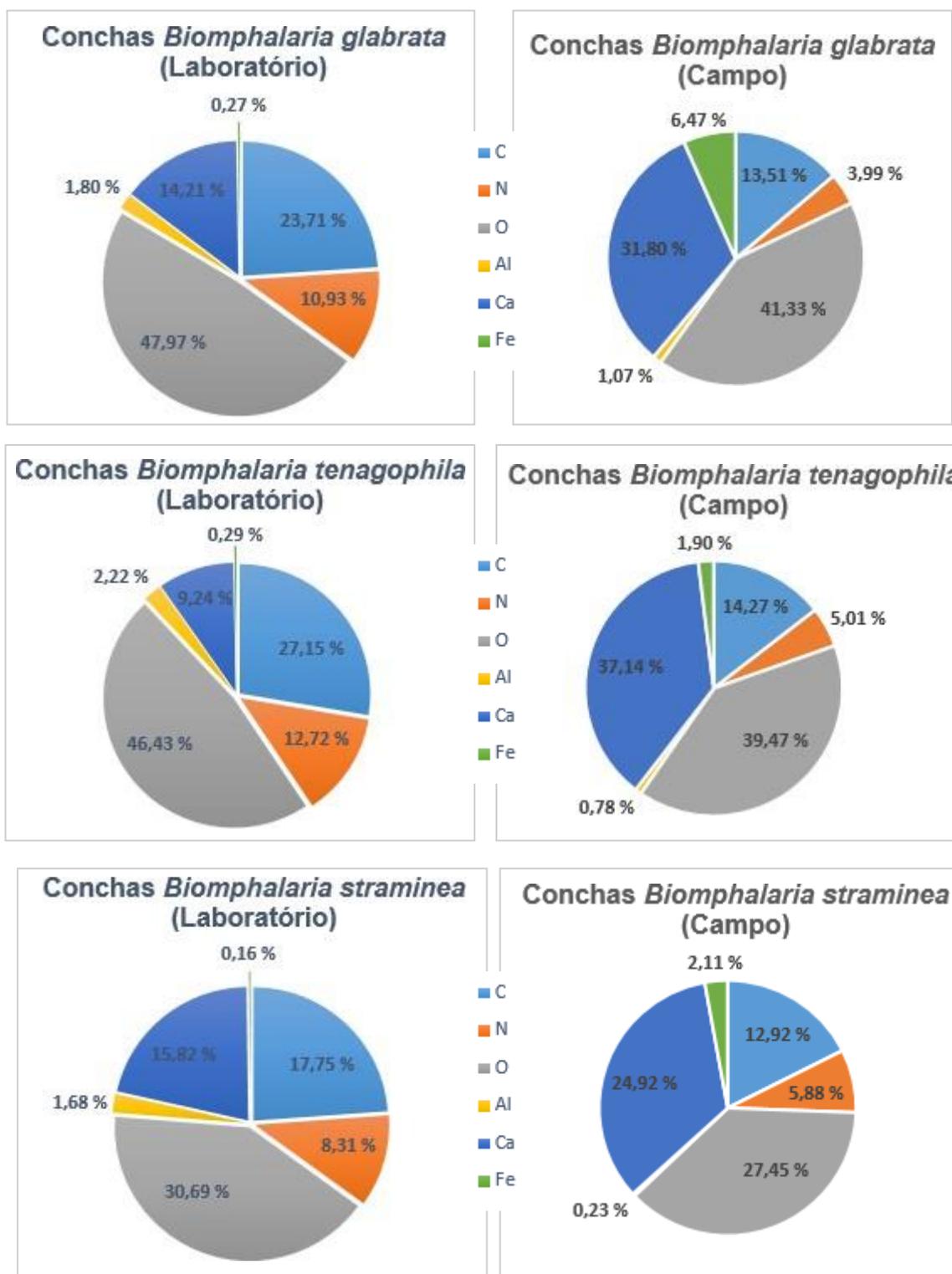
Tabela 4: Distribuição dos elementos químicos nas conchas de *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a origem das conchas (campo ou laboratório), a matriz da concha (orgânica ou inorgânica) e a região da concha em que foi observada (umbigo ou última volta).

Espécie / Origem /		Elementos químicos (média %)														
Matriz / Região	n	C	N	O	F	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ca	Mn	Fe	Mo
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10	<b>19,86</b>	<b>11,00</b>	<b>44,78</b>	<b>2,20</b>	<b>0,27</b>	<b>0,15</b>	<b>1,42</b>	<b>0,64</b>	<b>0,59</b>	<b>0,45</b>	<b>0,22</b>	<b>20,30</b>	<b>1,51</b>	<b>3,58</b>	<b>0,51</b>
<b>Campo</b>		<b>13,79</b>	<b>6,88</b>	<b>41,45</b>	<b>2,42</b>	<b>0,24</b>	<b>0,13</b>	<b>1,10</b>	<b>0,87</b>	<b>0,69</b>	<b>0,57</b>	<b>0,21</b>	<b>29,18</b>	<b>1,51</b>	<b>7,93</b>	<b>0,56</b>
Orgânica		14,15	6,40	41,76	---	0,23	0,08	1,00	1,01	0,78	0,35	0,15	24,40	1,67	10,77	0,54
Umbigo		12,66	6,75	41,01	---	0,19	0,06	0,87	0,40	0,47	0,30	---	33,83	1,55	5,01	0,63
Última Volta	5	15,63	6,05	42,52	---	0,30	0,13	1,13	1,62	0,96	0,40	0,15	14,97	1,76	16,53	0,37
Inorgânica		13,09	8,46	40,84	2,42	0,26	0,20	1,29	0,60	0,47	1,29	0,25	38,75	0,67	2,25	0,58
Umbigo		13,98	8,19	40,53	---	0,24	0,20	1,90	0,65	0,51	1,81	0,19	36,95	---	2,51	0,40
Última Volta		11,76	9,01	41,30	2,42	0,28	---	0,38	0,52	0,38	0,27	0,38	41,45	0,67	1,86	0,67
<b>Laboratório</b>		<b>24,41</b>	<b>13,83</b>	<b>47,28</b>	<b>2,17</b>	<b>0,32</b>	<b>0,16</b>	<b>1,67</b>	<b>0,44</b>	<b>0,47</b>	<b>0,33</b>	<b>0,22</b>	<b>13,63</b>	---	<b>0,32</b>	<b>0,47</b>
Orgânica		30,74	15,04	47,48	2,70	0,53	0,19	2,06	0,25	0,42	0,30	0,11	3,24	---	0,24	0,36
Umbigo		26,81	13,16	50,82	5,34	0,64	0,22	1,03	0,22	0,55	0,32	0,11	6,25	---	0,35	0,55
Última Volta	5	34,67	16,92	44,15	0,95	0,31	0,17	3,10	0,28	0,17	0,25	0,12	0,24	---	0,13	0,23
Inorgânica		18,09	12,48	47,09	0,83	0,21	0,15	1,27	0,60	0,57	0,36	0,30	24,02	---	0,40	1,02
Umbigo		14,53	13,35	49,83	1,26	0,24	0,21	1,18	0,26	0,83	0,26	0,22	26,89	---	0,20	1,02
Última Volta		21,64	11,39	44,34	0,40	0,18	0,12	1,36	0,88	0,45	0,49	0,33	21,14	---	0,60	---

Tabela 5: Distribuição dos elementos químicos nas conchas de *B. tenagophila*, de acordo com a origem das conchas (campo ou laboratório), a matriz da concha (orgânica ou inorgânica) e a região da concha em que foi observada (umbigo ou última volta).

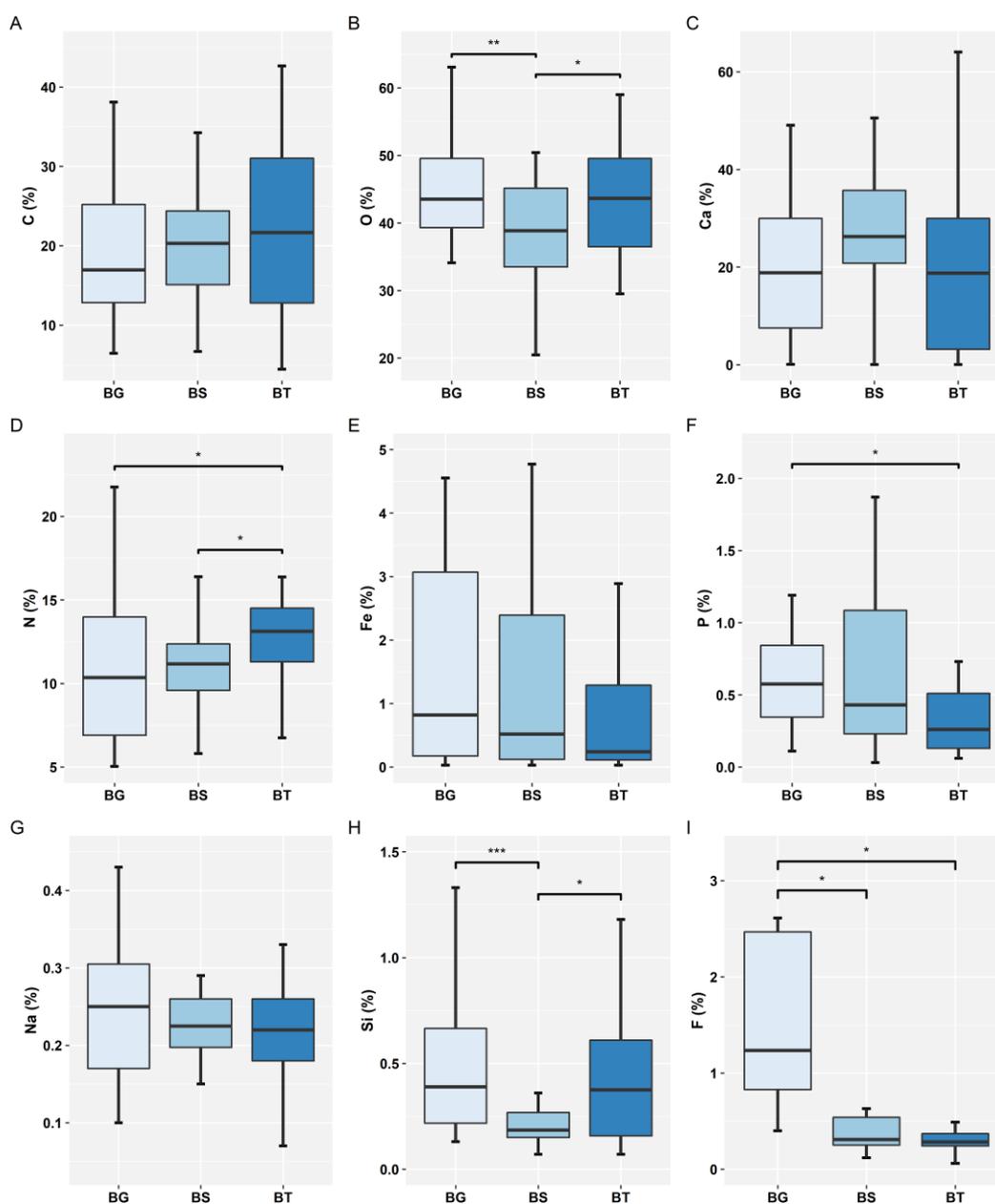
Espécie / Origem / Matriz /		Elementos químicos (média %)														
Região	n	C	N	O	F	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ca	Mn	Fe	Mo
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	<b>21,77</b>	<b>13,51</b>	<b>43,72</b>	<b>1,01</b>	<b>0,23</b>	<b>0,15</b>	<b>1,61</b>	<b>0,99</b>	<b>0,46</b>	<b>0,37</b>	<b>0,23</b>	<b>20,32</b>	<b>8,95</b>	<b>1,29</b>	<b>0,88</b>
<b>Campo</b>		<b>16,21</b>	<b>10,14</b>	<b>39,97</b>	<b>3,32</b>	<b>0,22</b>	<b>0,15</b>	<b>0,81</b>	<b>0,34</b>	<b>0,90</b>	<b>0,37</b>	<b>0,27</b>	<b>33,12</b>	<b>11,60</b>	<b>2,69</b>	<b>1,19</b>
Orgânica		20,07	10,36	38,75	3,32	0,24	0,17	0,52	0,24	0,54	0,36	0,27	26,46	14,71	2,75	0,92
Umbigo		11,11	7,89	43,86	---	0,23	0,14	0,30	0,31	0,59	0,20	---	31,73	0,45	4,63	0,32
Última Volta	5	27,24	12,33	34,65	3,32	0,25	0,28	0,69	0,17	0,47	0,45	0,27	22,25	28,96	1,24	1,53
Inorgânica		10,42	8,20	41,81	---	0,18	0,09	1,26	1,18	2,69	0,41	---	43,12	5,38	2,51	2,26
Umbigo		11,63	8,20	39,64	---	0,18	0,09	1,73	1,18	2,69	0,47	---	41,95	5,38	3,75	2,26
Última Volta		7,99	---	46,14	---	0,16	---	0,31	---	---	0,35	---	45,48	---	0,03	---
<b>Laboratório</b>		<b>26,68</b>	<b>15,61</b>	<b>47,03</b>	<b>0,24</b>	<b>0,25</b>	<b>0,15</b>	<b>2,31</b>	<b>1,38</b>	<b>0,20</b>	<b>0,37</b>	<b>0,22</b>	<b>9,03</b>	<b>1,02</b>	<b>0,30</b>	<b>0,37</b>
Orgânica		32,41	17,32	46,14	0,24	0,25	0,15	1,83	0,38	0,14	0,32	0,10	1,31	---	0,15	0,46
Umbigo		30,17	14,06	50,33	0,27	0,31	0,17	1,77	0,57	0,17	0,43	0,06	2,14	---	0,15	0,46
Última Volta	5	34,64	20,57	41,95	0,20	0,13	0,10	1,89	0,13	0,07	0,18	0,13	0,47	---	0,15	---
Inorgânica		18,51	12,76	48,30	---	0,25	0,15	3,01	2,90	0,33	0,48	0,34	20,05	1,02	0,53	0,32
Umbigo		15,53	12,70	50,60	---	0,29	---	1,73	0,81	0,29	0,30	0,12	24,21	1,02	0,44	0,32
Última Volta		25,94	13,08	42,56	---	0,22	0,15	6,20	7,06	0,42	0,66	0,45	9,66	---	0,74	---





**Figura 15:** Gráficos dos resultados semi-quantitativos (%) dos elementos químicos presentes nas conchas de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*.

Oxigênio, nitrogênio, fósforo, silício e flúor apresentaram diferenças interespecíficas significativas, quando analisadas as conchas de campo e laboratório. Nitrogênio e flúor, nesse caso, obtiveram destaque no fato de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, respectivamente, demonstrando diferença significativa frente as outras duas espécies. Já os elementos carbono, cálcio, ferro e sódio não apresentaram diferença significativa ao compararmos as três espécies, sem distinção de campo e laboratório (figura 16). Não foi encontrado elemento químico exclusivo para nenhuma das três espécies analisadas.

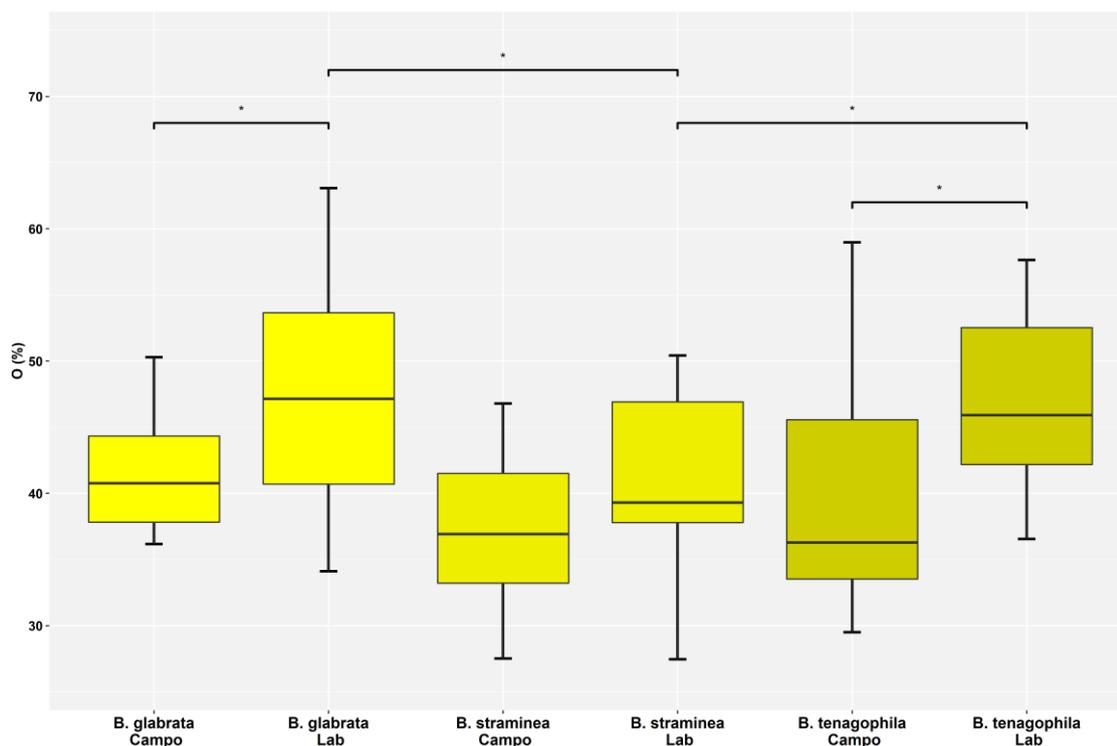


**Figura 16:** Boxplot da concentração dos elementos químicos identificados no MEV/EDS entre as espécies *Biomphalaria glabrata* (Bg), *Biomphalaria straminea* (Bs) e *Biomphalaria tenagophila*

(Bt). (A) carbono, (B) oxigênio, (C) cálcio, (D) nitrogênio, (E) ferro, (F) fósforo, (G) sódio, (H) silício e (I) flúor. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 5.2.1 Oxigênio (O)

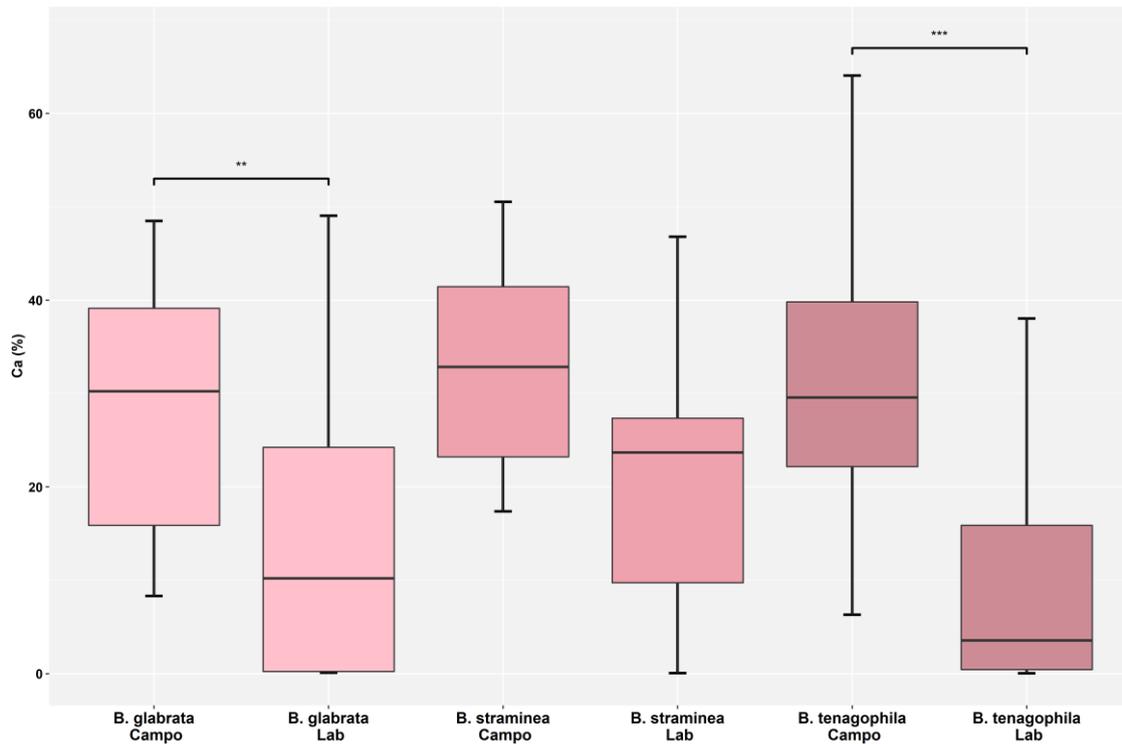
O elemento oxigênio apresentou-se em maior quantidade nas populações de laboratório, com diferença significativa nas espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila* quando comparadas às populações de campo das mesmas espécies. Além disso, dentre as populações criadas em laboratório, as conchas de *B. straminea* possuíam menor quantidade desse elemento, apresentando diferença significativa quando comparada à demais espécies (figura 17).



**Figura 17:** Comparação da concentração do elemento oxigênio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

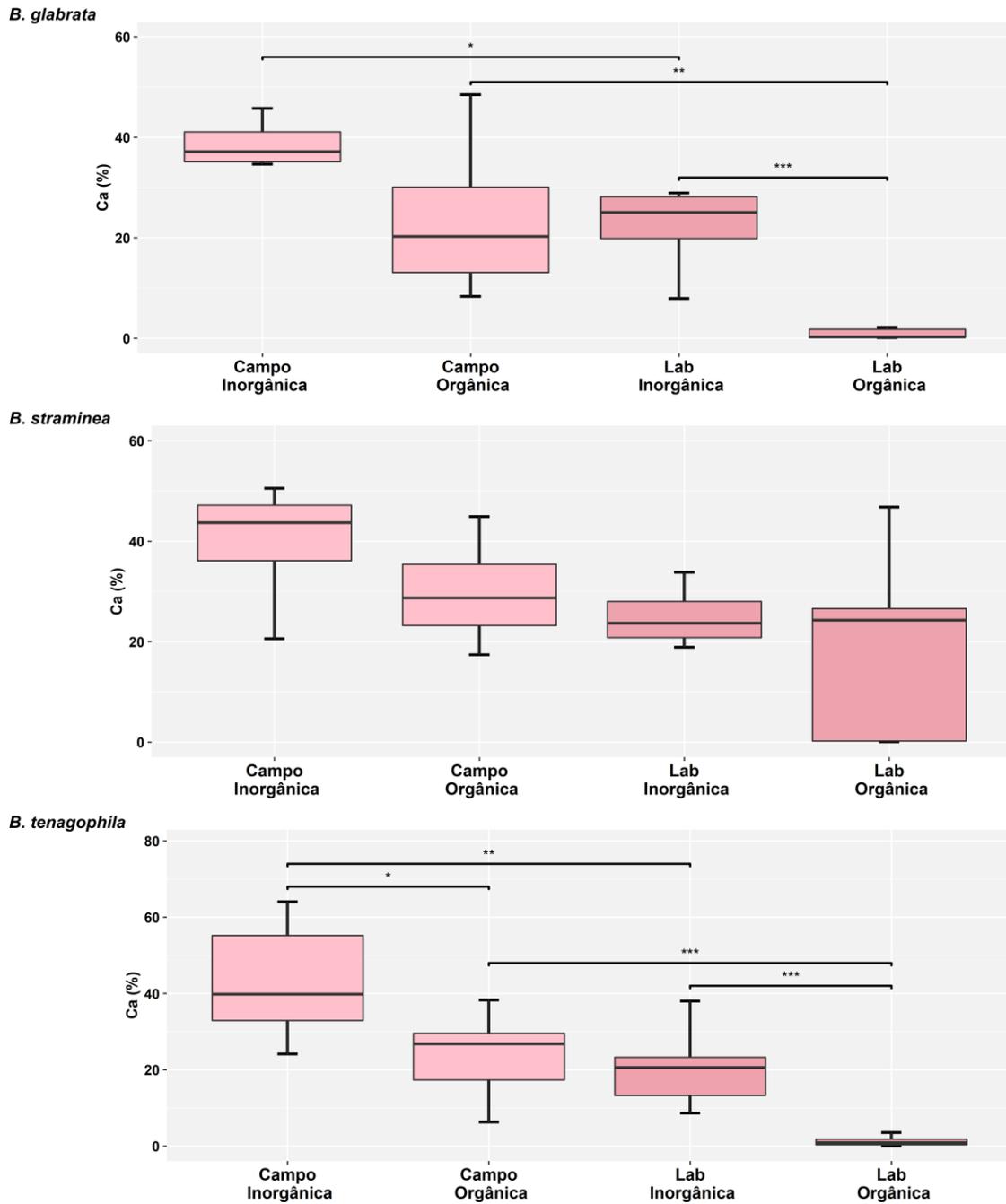
### 5.2.2 Cálcio (Ca)

As conchas de todas as espécies de campo expressaram maior quantidade de cálcio em relação às de laboratório, apresentando diferença significativa em *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Em uma análise interespecífica nos dois grupos (laboratório e campo) não foi encontrada diferença que apresentasse significância (figura 18).



**Figura 18:** Comparação da concentração do elemento cálcio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

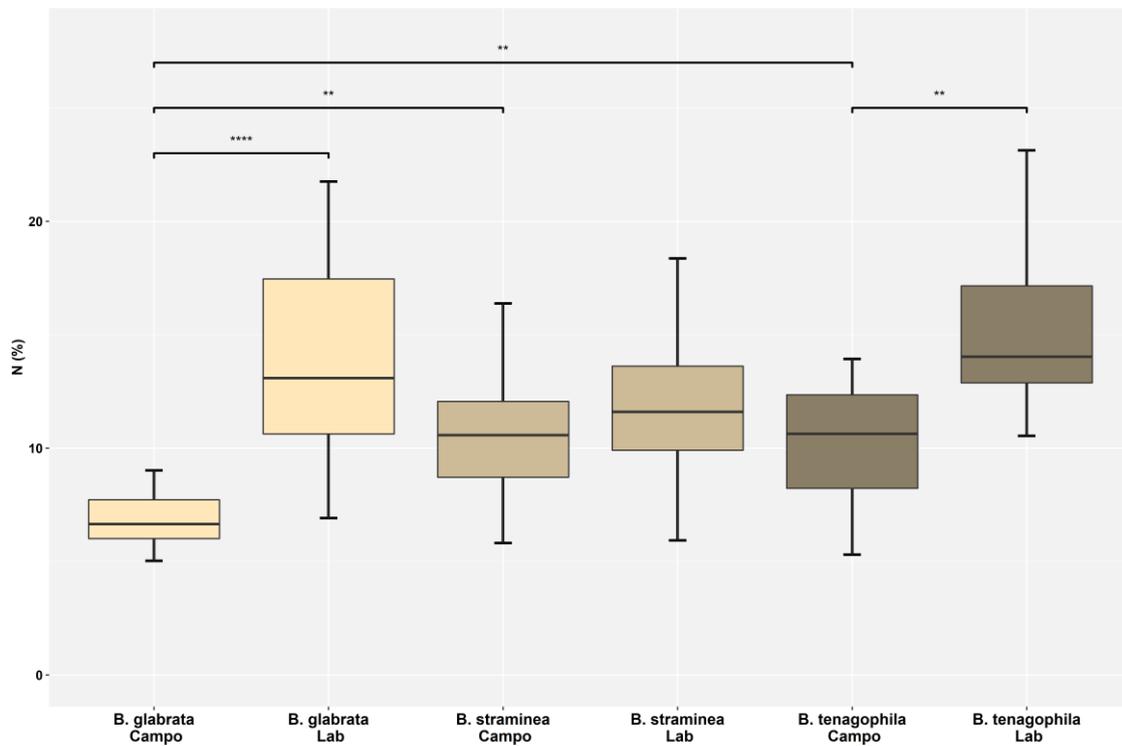
Comparando a região do perióstraco (matriz orgânica) e região da camada prismática (matriz inorgânica), a segunda camada apresentou a maior quantidade de cálcio tanto nas populações de laboratório como nas de campo. Comparando as concentrações de cálcio nos espécimes de *B. straminea* coletadas em campo e mantidas em laboratório não houve diferença significativa, porém é possível notar que tanto em *B. glabrata* quanto em *B. tenagophila* as populações de campo apresentaram essa diferença frente às populações de laboratório (figura 19).



**Figura 19:** Comparação da concentração do elemento cálcio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, com relação à origem (campo ou laboratório) e à integridade da Matriz (Inorgânica ou Orgânica). Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 5.2.3 Nitrogênio (N)

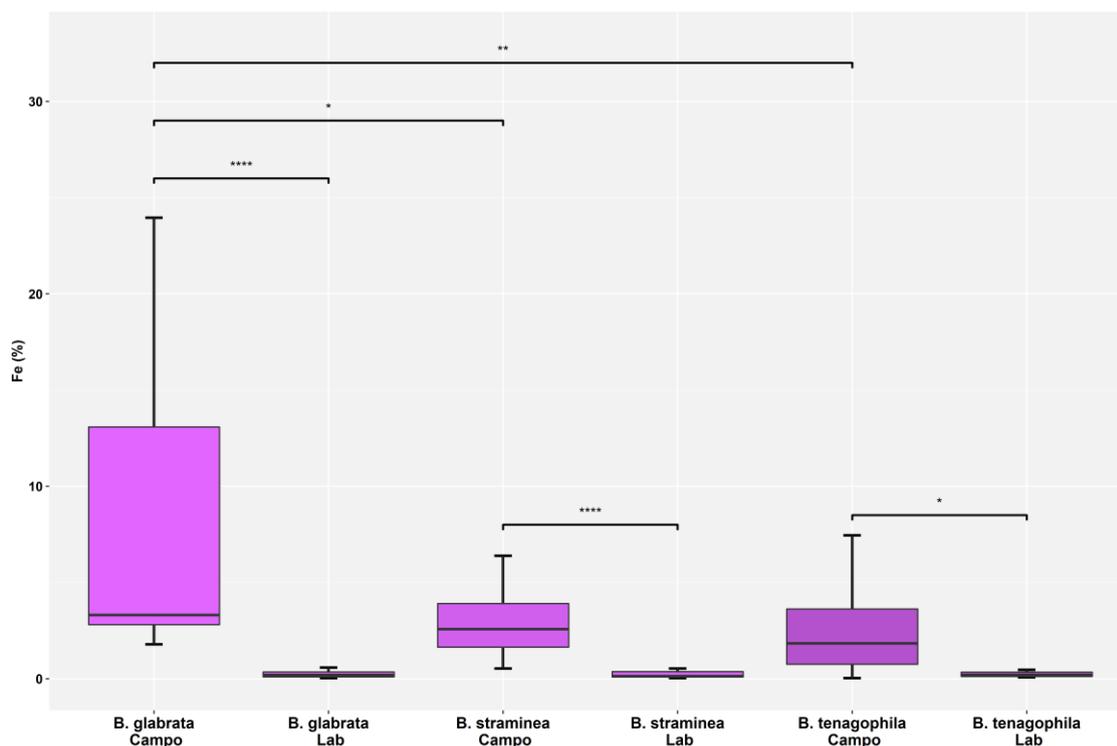
Dentre as conchas de campo, foi identificada menor quantidade significativa de nitrogênio em *B. glabrata* em comparação às outras duas espécies do mesmo grupo. Porém, ao compararmos a criação (campo e laboratório) notamos diferença significativa entre a população de laboratório, *B. glabrata* e *B. tenagophila*, e de campo dessas mesmas espécies (figura 20).



**Figura 20:** Comparação da concentração do elemento nitrogênio entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

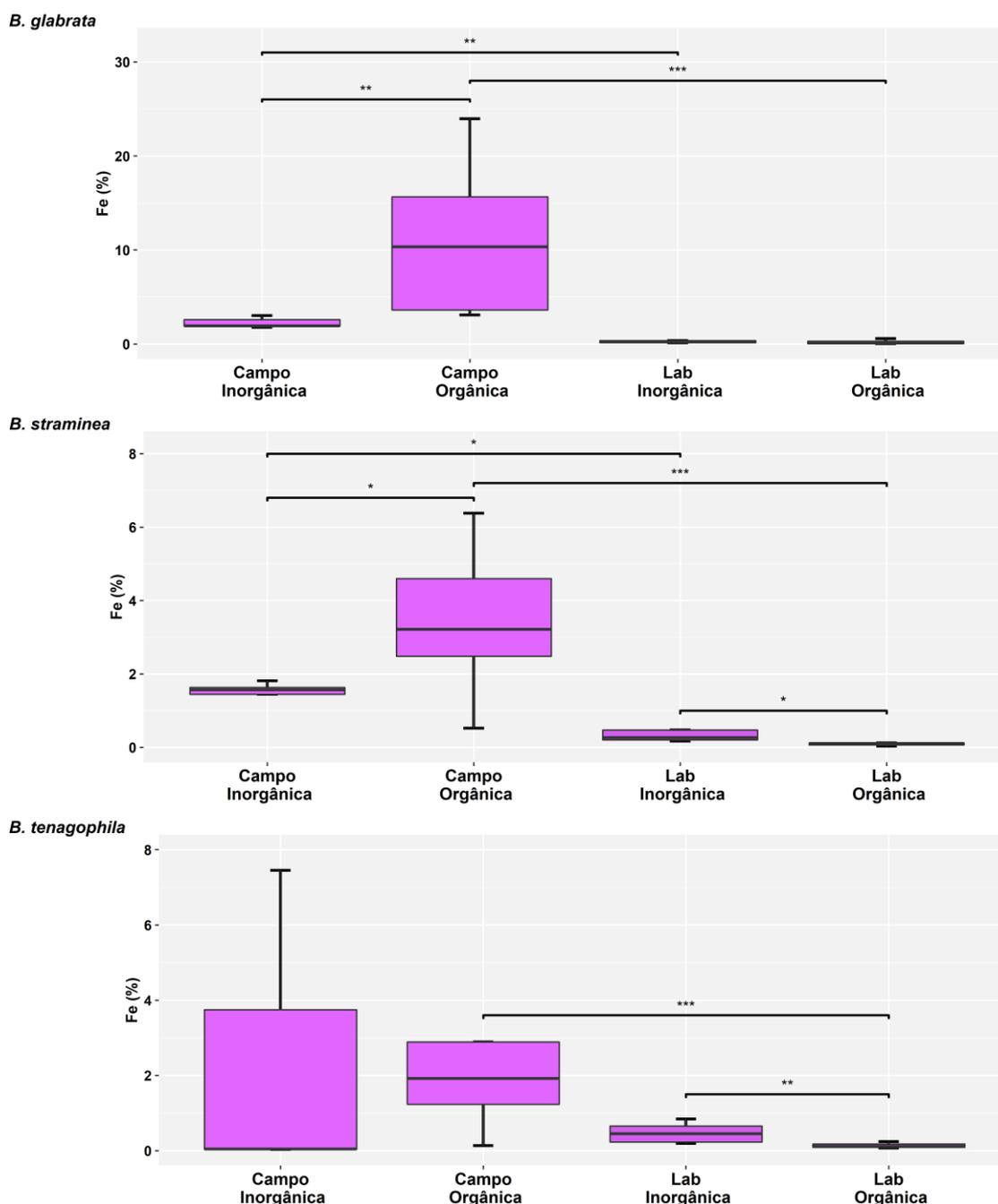
### 5.2.4 Ferro (Fe)

O ferro foi identificado em maior parte nas conchas das populações de campo, apresentando diferença significativa entre *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* dessa população e de laboratório. Além disso, *B. glabrata* foi a espécie com maior quantidade desse elemento e apresentando, também, diferença considerável em comparação às demais da população de campo (figura 21).



**Figura 21:** Comparação da concentração do elemento ferro entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

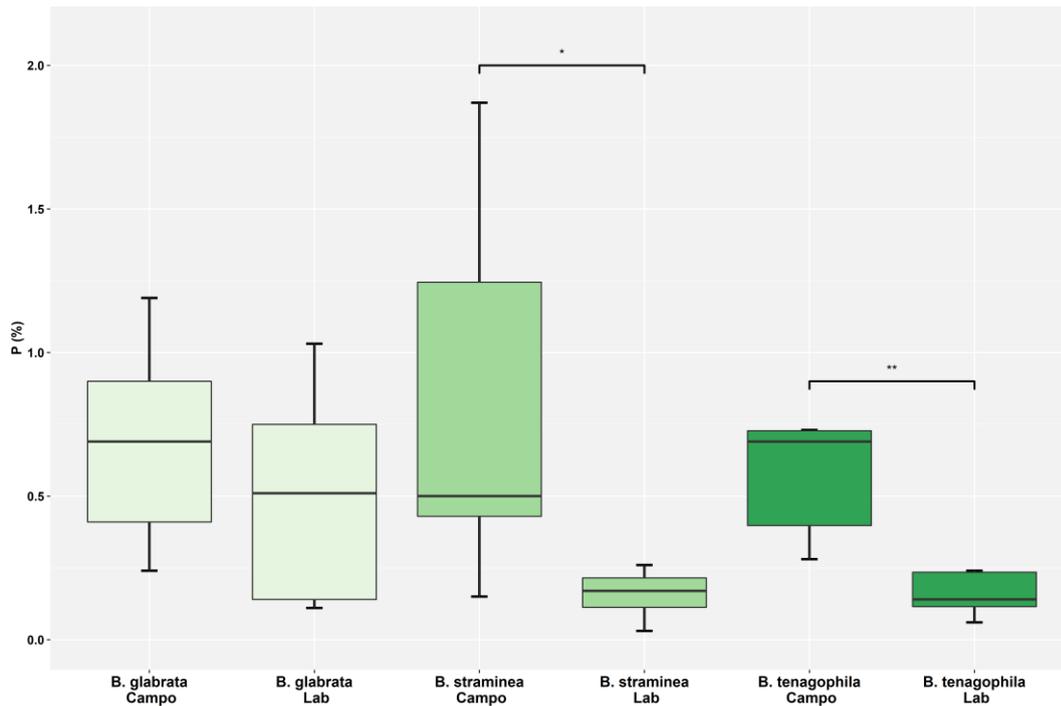
Tanto a matriz orgânica quanto a inorgânica das conchas de campo obtiveram maior quantidade de ferro do que as matrizes das conchas de laboratório. Porém, a matriz inorgânica das conchas de laboratório de *B. straminea* e *B. tenagophila* apresentaram diferença significativa frente a matriz orgânica das conchas do mesmo grupo (figura 22).



**Figura 22:** Comparação da concentração do elemento ferro entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, com relação à origem (campo ou laboratório) e à integridade da Matriz (Inorgânica ou Orgânica). Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 5.2.5 Fósforo (P)

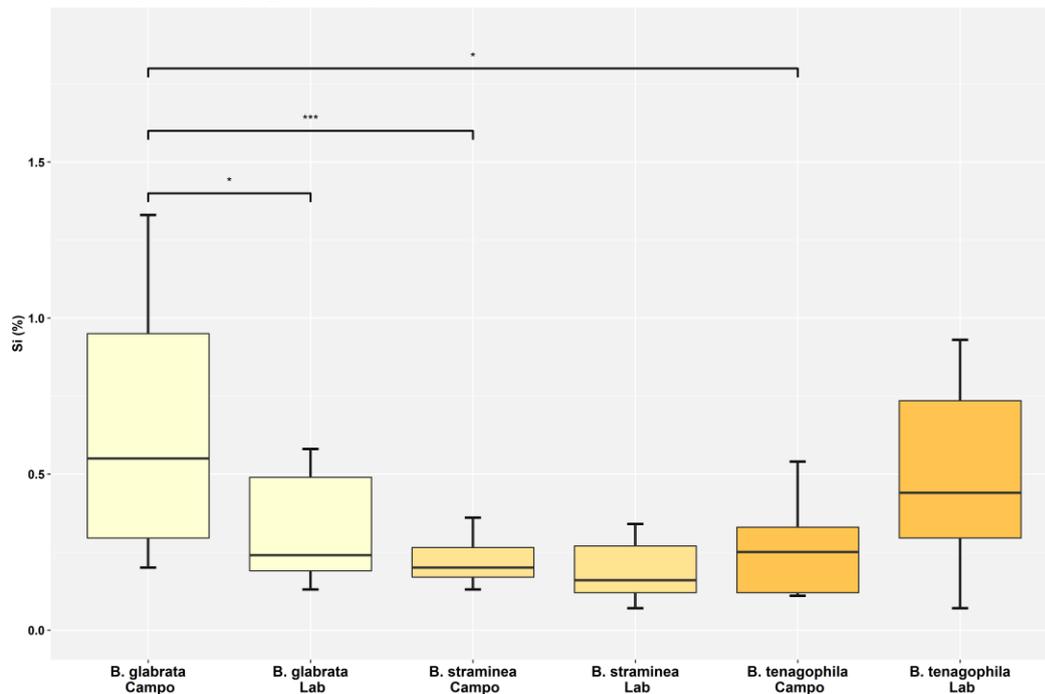
O elemento fósforo foi identificado em maior quantidade nas conchas de campo, apresentando diferença significativa em *B. straminea* e *B. tenagophila* (figura 23).



**Figura 23:** Comparação da concentração do elemento fósforo entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 5.2.6 Silício (Si)

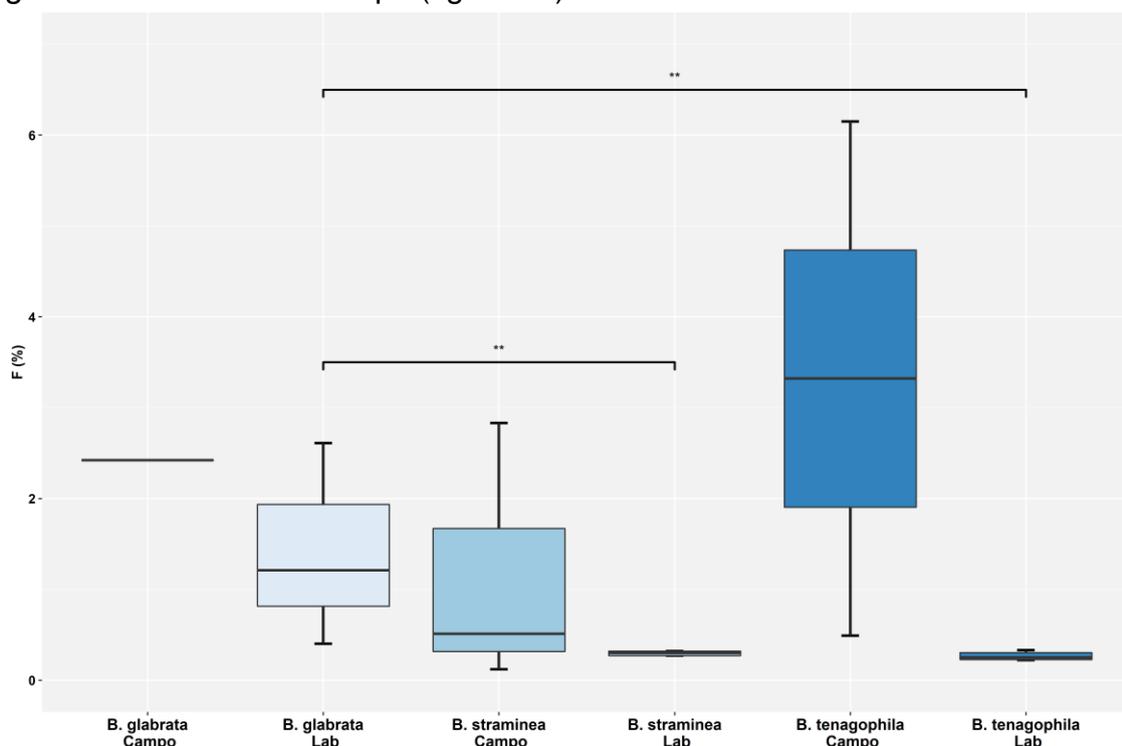
As conchas de *B. glabrata* da população de campo apresentaram maior quantidade de silício com diferença significativa intraespecífica e em relação às demais espécies (figura 24).



**Figura 24:** Comparação da concentração do elemento silício entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

### 5.2.7 Flúor (F)

O elemento flúor foi identificado em maior quantidade em *B. tenagophila* da população de campo, porém não houve diferença significativa. Já em relação ao grupo de laboratório, *B. glabrata* expressou esse elemento em maior quantidade com diferença significativa entre *B. tenagophila* e *B. straminea*. Não foi possível detectar com este método a presença de flúor nas conchas de *B. glabrata* coletada em campo (figura 25).



**Figura 25:** Comparação da concentração do elemento flúor entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, oriundas do campo e laboratório. Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

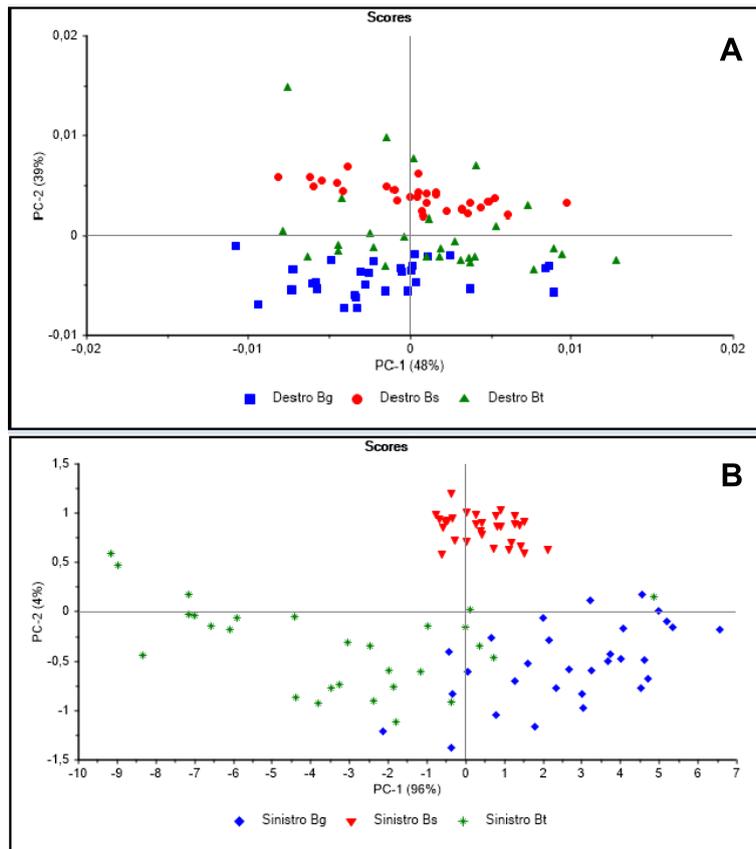
### 5.3 Protocolo de análise espectral de infravermelho próximo de caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil

Por não existirem trabalhos que apliquem o NIR em moluscos do gênero *Biomphalaria*, foi preciso testar metodologias para padronizar a forma de análise das espécies desse gênero no equipamento. Logo, alguns desses testes foram

realizados acerca do tamanho da concha, do posicionamento da mesma, da umidade presente, da quantidade de amostras utilizadas e a possibilidade de uso do animal vivo e/ ou infectado.

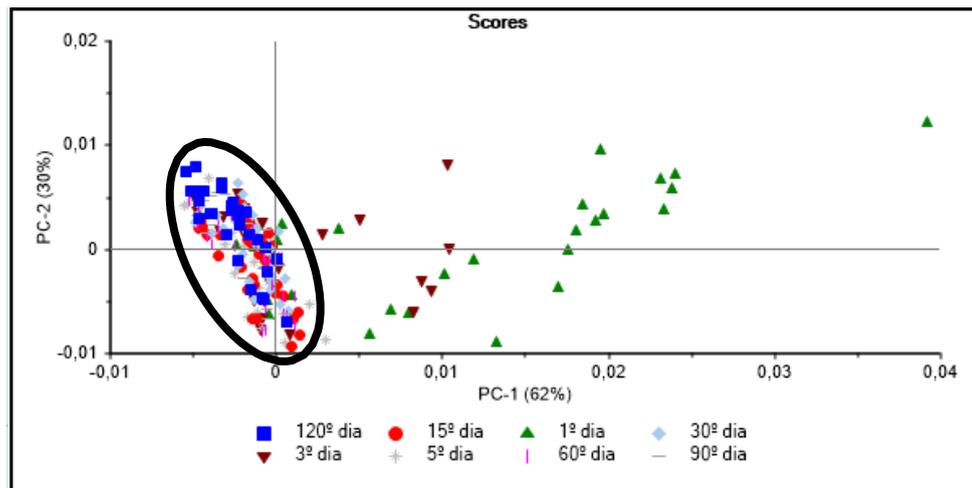
Acerca do tamanho da concha, considerando as variações de diâmetro entre as espécies, estipulamos medidas entre 8 a 10 mm, utilizando moluscos logo após o início da maturidade sexual. Além disso, exemplares de tamanhos muito distintos podem acabar influenciando na diferenciação das espécies, através do NIR. Logo, o ideal é que as amostras tenham a média de tamanho semelhante umas às outras.

Em relação a preferência, do posicionamento da concha do animal, em obter o espectro do lado esquerdo (sinistro), além de ser desse mesmo lado em que se encontram as estruturas reprodutoras do animal, ao comparar a PCA dos espectros obtidos dos dois lados de um mesmo grupo de conchas, nota-se que há uma melhor separação das espécies obtendo os espectros do lado sinistro. Na PCA com o lado direito da concha, a componente principal 1 (PC-1) foi menor que 50% (48%), enquanto que no lado esquerdo, a PC-1 foi de 96%. Devido a este fato, em todos os demais experimentos, tanto os espectros das conchas, quanto dos animais vivos, foram coletados do lado esquerdo (figura 26).



**Figura 26:** Análise de componentes principais do mesmo grupo de conchas em posicionamentos diferentes da concha sobre a janela do equipamento: **(A)** lado direito ou destro e **(B)** lado esquerdo ou sinistro. Sendo, (Bg): *Biomphalaria glabrata*; (Bt): *Biomphalaria tenagophila*; (Bs): *Biomphalaria straminea*.

Os espectros das conchas relacionadas a padronização da unidade demonstraram diferenças entre os períodos de secagem das amostras. Observando a PCA do conjunto de dados das populações de *B. glabrata* Jacobina/ BA, *B. tenagophila* Itamaraju/ BA e *B. straminea* Jaboticatubas/ MG, observou-se que os scores das amostras com 1 e 3 dias de secagem encontram-se mais dispersos do que os demais. Por outro lado, a partir do 5º dia de secagem os scores tendem a se agrupar, demonstrando maior semelhança e estabilidade entre eles (figura 27).



**Figura 27:** Análise de componentes principais dos resultados obtidos de conchas de *Biomphalaria* spp. em diferentes períodos de secagem.

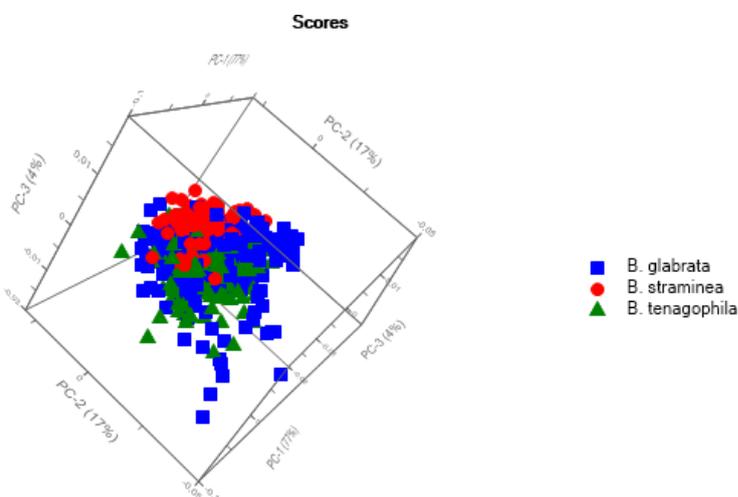
Com a aplicação do método de classificação LDA, observou-se melhores resultados em número de acertos nos dados obtidos a partir do 15º dia de secagem das amostras.

#### 5.4 Modelo espectrofotométrico de classificação de *Biomphalaria* spp.

##### 5.4.1 Espécimes vivos

Foram construídos três modelos de classificação de relação interespecífica, a partir de espécimes vivos de populações de laboratório e campo, separadamente, e de todas as amostras juntas das três espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil. Além disso, foram criados três modelos de classificação de relação intraespecífica com os espécimes de laboratório e campo da mesma população de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

A validação externa do modelo de classificação, construído a partir de espécimes vivos de populações diferentes, incluindo de campo e de laboratório, das três espécies de *Biomphalaria*, apresentou a PCA com a PC-2 com 14% de variação entre elas (figura 28) e com taxas de classificação de acertos diferenciadas como apresentadas na tabela 7.

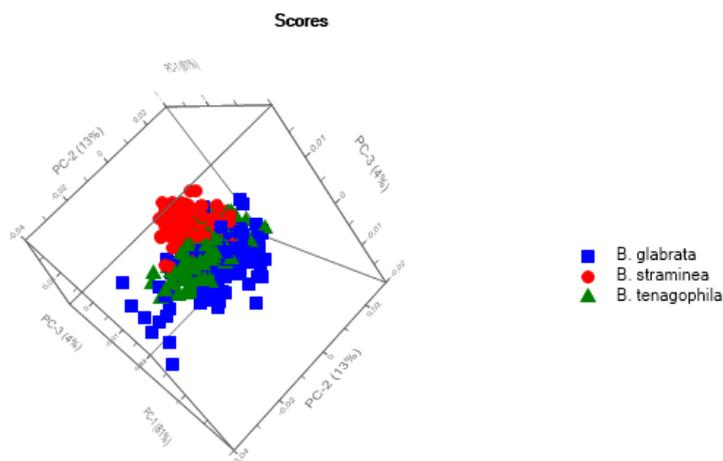


**Figura 28:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de diferentes populações de laboratório e campo.

Tabela 7: Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de *Biomphalaria* analisada a partir do modelo de classificação total, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).

<b>Espécies</b>	<b>Modelo (n)</b>	<b>Validação (n)</b>	<b>Acertos (%)</b>
<i>B. glabrata</i>	116	78	46,15
<i>B. tenagophila</i>	93	62	77,41
<i>B. straminea</i>	89	60	76,66

O modelo de classificação construído a partir de espécimes vivos de populações de laboratório das três espécies de *Biomphalaria*, apresentou a PCA com a PC-2 com 14% de variação entre elas (figura 29) e sua validação externa obteve taxas de classificação de acertos diferenciadas como apresentadas na tabela 8.

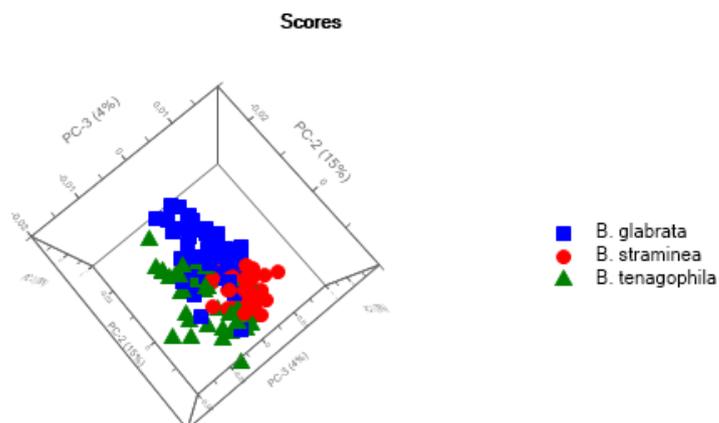


**Figura 29:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de populações de laboratório.

Tabela 8: Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de *Biomphalaria* analisada a partir do modelo de classificação de laboratório, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).

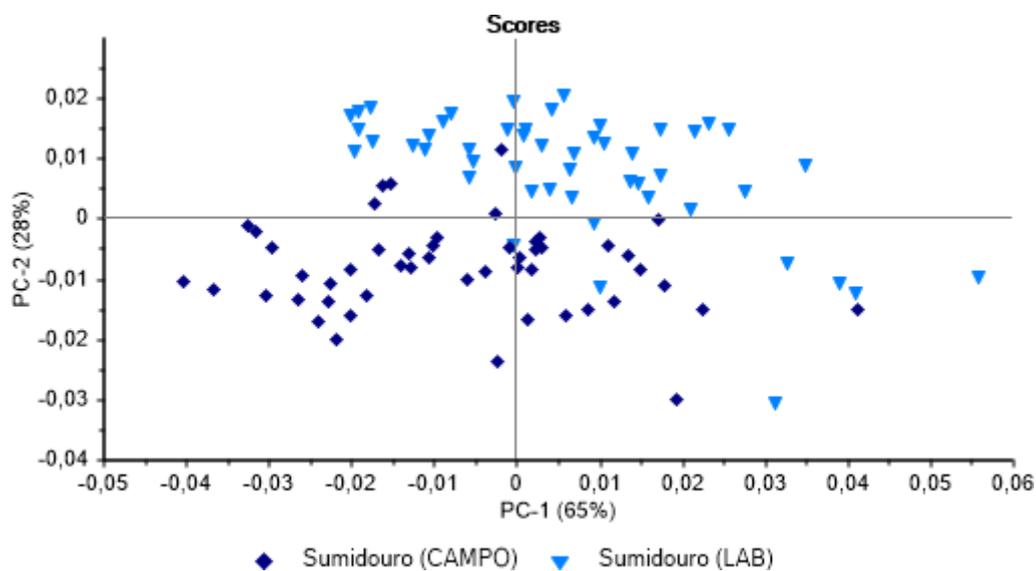
<b>Espécies</b>	<b>Modelo (n)</b>	<b>Validação (n)</b>	<b>Acertos (%)</b>
<i>B. glabrata</i>	86	58	60
<i>B. tenagophila</i>	63	42	95
<i>B. straminea</i>	59	40	72,5

O último modelo de classificação construído a partir da relação interespecífica dos espécimes vivos de populações de campo, apresentou a PCA com a PC-2 com 15% de variação entre elas (figura 30) e sua validação externa obteve 75% de taxa de classificação de acertos.

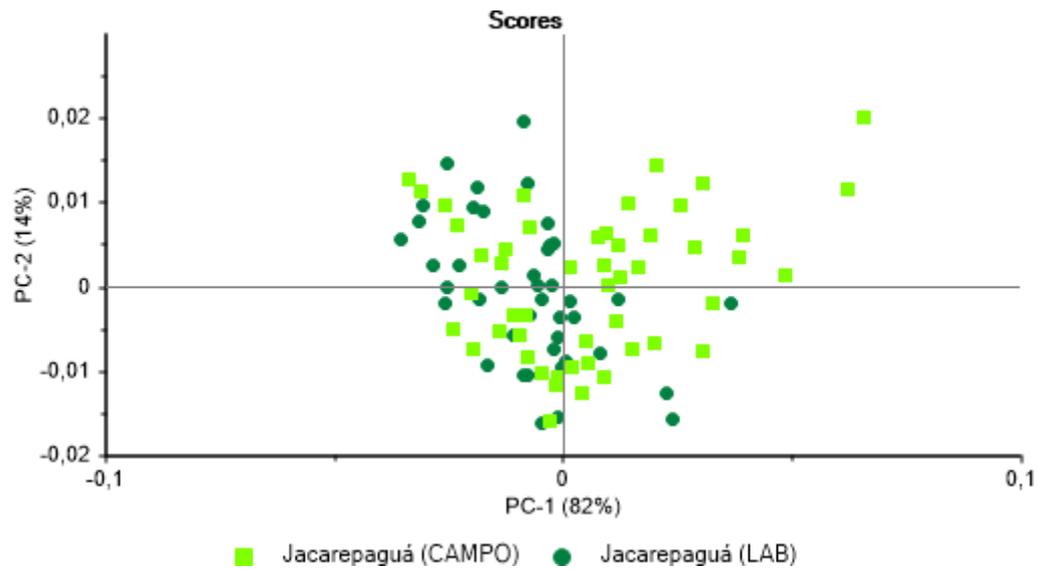


**Figura 30:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de populações de campo.

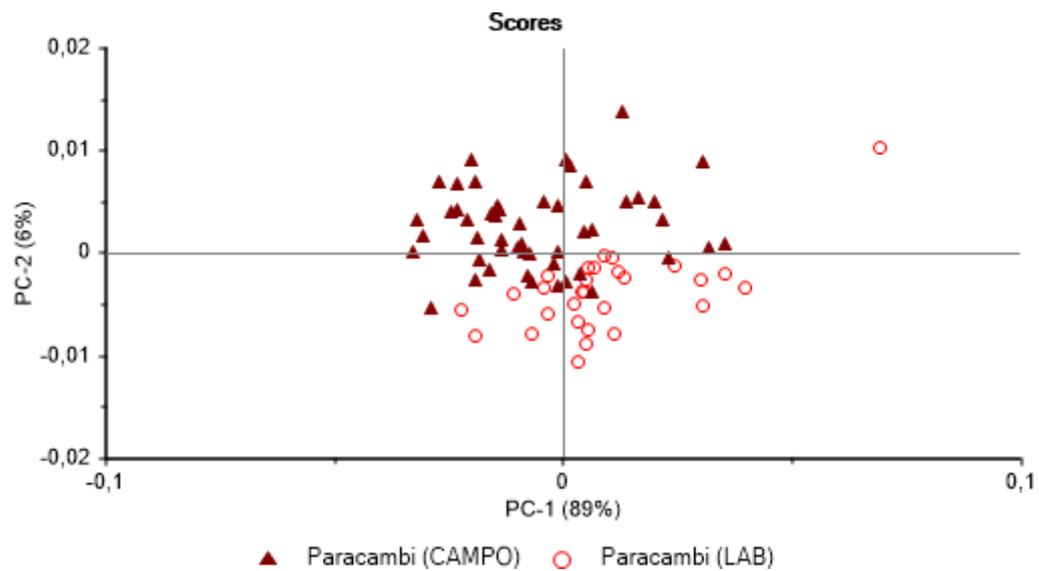
A validação externa dos modelos de classificação intraespecíficos dos animais vivos coletados em campo e mantidos em laboratório da mesma população de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* obteve taxas de classificação de acertos para cada espécie conforme apresentado na tabela 9. A PCA das amostras de cada grupo foi realizada e os scores foram dispostos conforme as figuras a seguir.



**Figura 31:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria glabrata* de mesma população de laboratório e de campo.



**Figura 32:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria tenagophila* de mesma população de laboratório e de campo.



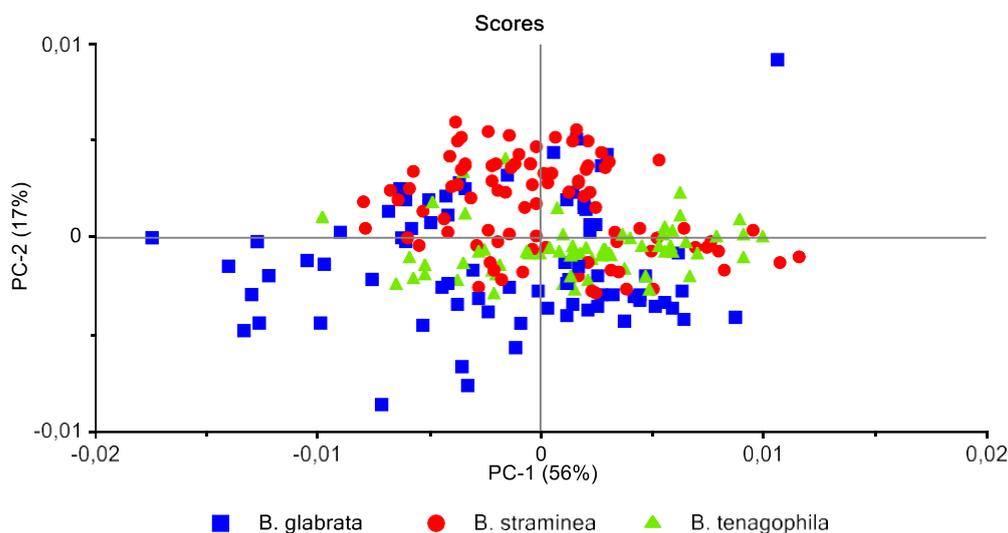
**Figura 33:** Análise de componentes principais de espécimes vivos de *Biomphalaria straminea* de mesma população de laboratório e de campo.

Tabela 9: Taxas de classificação de acertos de cada espécie de *Biomphalaria* analisada a partir de amostras da mesma população coletadas em campo e mantidas em laboratório, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).

<b>Análise intraespecífica</b>			
<b>Laboratório X Campo</b>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>
<b>Modelo (n)</b>	60	52	47
<b>Validação (n)</b>	40	40	32
<b>Acertos (%)</b>	85	72,5	77,5

#### 5.4.2 Conchas

A análise de componentes principais das amostras de conchas das três espécies de *Biomphalaria*, hospedeiras de *S. mansoni* (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) mantidas em laboratório e coletadas recentemente no campo demonstrou ser capaz de diferenciar as três espécies, utilizando somente as conchas, com uma PC-2 de 17% (figura 34) e a validação externa obteve taxas de classificação de acertos diferenciadas como apresentadas na tabela 11.

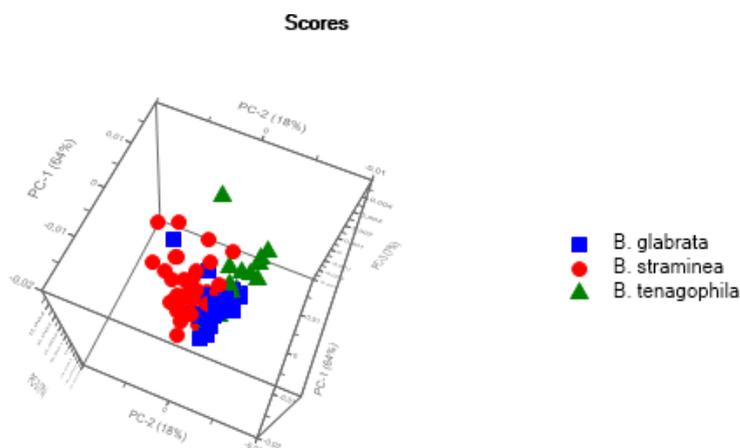


**Figura 34:** Análise de componentes principais de conchas de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de diferentes populações de laboratório e de campo.

Tabela 10: Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de *Biomphalaria* analisada utilizando somente conchas de laboratório e campo, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).

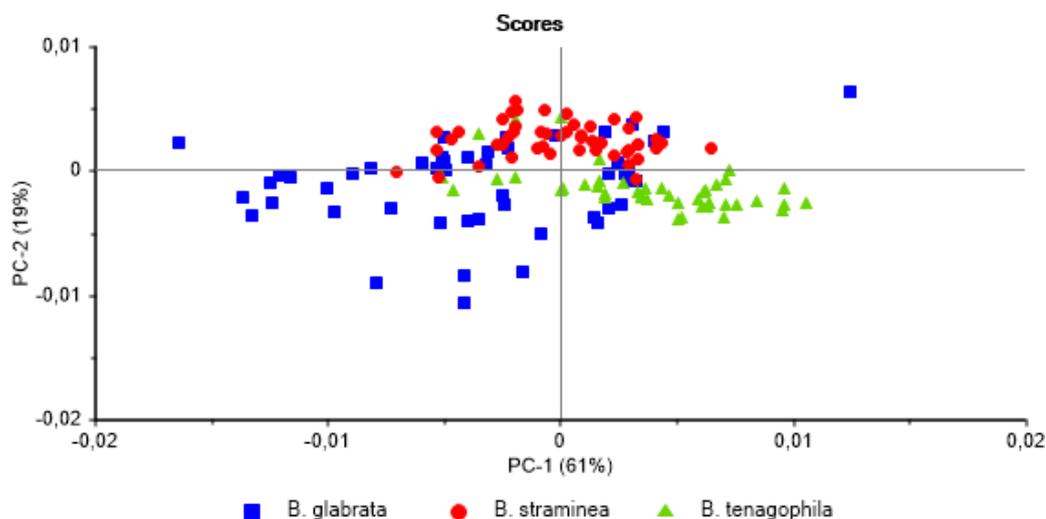
<b>Espécies</b>	<b>Modelo (n)</b>	<b>Validação (n)</b>	<b>Acertos (%)</b>
<i>B. glabrata</i>	46	30	63,33
<i>B. tenagophila</i>	39	24	66,66
<i>B. straminea</i>	55	36	66,66

O modelo de classificação construído a partir de conchas de populações de laboratório das três espécies de *Biomphalaria*, apresentou a PCA com a PC-1 com 64% de variação entre elas (figura 35) e sua validação externa obteve taxa de classificação de acertos de 64,70%.



**Figura 35:** Análise de componentes principais de conchas de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de populações de laboratório.

A validação externa do modelo de classificação construído somente com conchas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, coletadas em campo, obteve taxa de classificação de acertos conforme a tabela 11 e PCA-1 com 61% de variação.



**Figura 36:** Análise de componentes principais de conchas de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* de populações de campo.

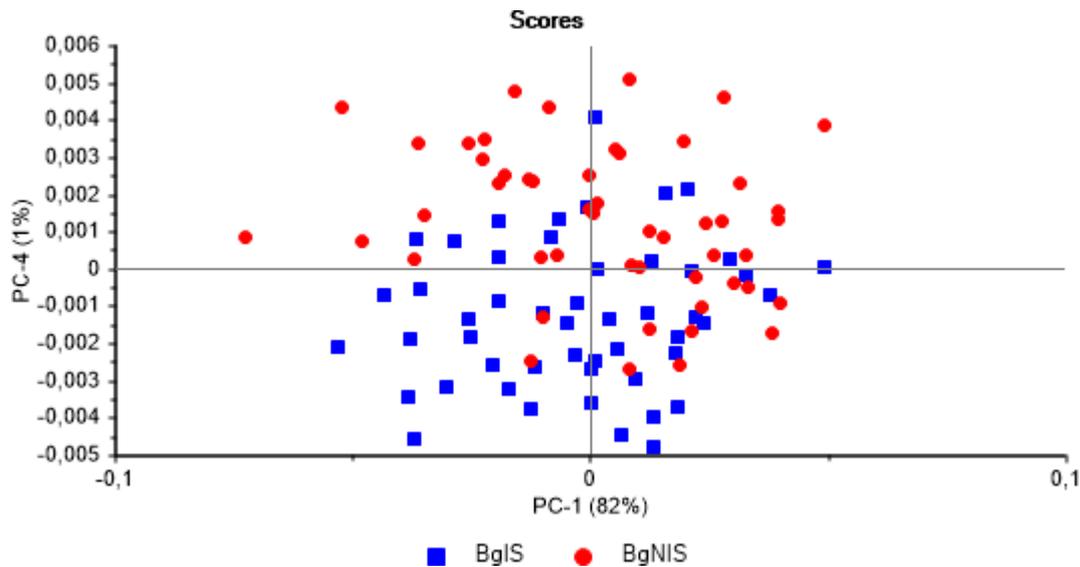
Tabela 11: Diferentes taxas de classificação de acertos de cada espécie de *Biomphalaria* analisada, utilizando somente conchas de campo, obtida a partir da Análise Discriminante Linear (LDA).

<b>Espécies</b>	<b>Modelo (n)</b>	<b>Validação (n)</b>	<b>Acertos (%)</b>
<i>B. glabrata</i>	35	15	46,66
<i>B. tenagophila</i>	28	15	93,33
<i>B. straminea</i>	35	15	100

### **5.5 Modelo espectrofotométrico de classificação de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni***

A utilização do FT-NIR como ferramenta de diagnóstico parasitológico em espécimes vivos de *B. glabrata* infectados por *S. mansoni*, possibilitou classificar e diferenciar os moluscos positivos dos moluscos não expostos à infecção (grupo controle).

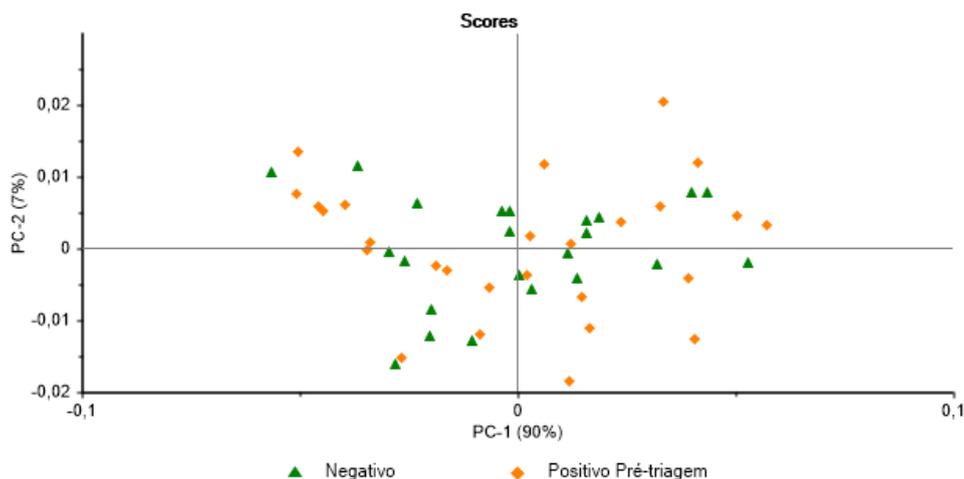
No modelo de classificação construído com o grupo pós-triagem e o grupo controle nota-se que na PCA a concentração dos moluscos infectados e positivos (grupo pós-triagem) está acima e dos moluscos não expostos à infecção por *S. mansoni* (grupo controle) abaixo, com a PC-1 apresentando 82% de variação, o que caracteriza uma separação desses dois grupos (figura 37).



**Figura 37:** Análise de componentes principais das amostras de espécimes vivos infectados (grupo pós-triagem) e não expostos à infecção (grupo controle) de *Biomphalaria glabrata*. Sendo, (BglS): *Biomphalaria glabrata* infectada; (BgNIS): *Biomphalaria glabrata* não exposta à infecção.

Com a realização do LDA como método de classificação, a taxa de acerto da validação externa foi de 82,5%, sendo 30 animais de cada grupo (controle e infectado pós-triagem) selecionados aleatoriamente para compor o modelo e os demais para a validação. Foram observados 7 erros, 4 deles em relação ao animal infectado (números 32; 34; 36 e 38), não estando relacionado a quantidade de cercárias. Logo, a quantidade de cercárias eliminadas não apresentou relação com os resultados dos espectros obtidos no FT-NIR.

Após a construção do modelo de classificação do grupo pré-triagem observou-se que na PCA, tanto os animais positivos quanto os expostos negativos têm seus scores misturados, dificultando a separação desses dois grupos (figura 38). Com a realização do LDA, a validação obteve acerto de 40%, sendo selecionado randomicamente um total de 30 animais para compor o modelo e 20 para a validação.



**Figura 38:** Análise de componentes principais das amostras de espécimes vivos de *Biomphalaria glabrata* expostos à infecção antes da triagem. Após foram separados em grupos positivos e expostos negativos.

## 6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho a descrever a ultraestrutura e a composição química das conchas das três espécies de *Biomphalaria*, hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil. Quanto à caracterização ultraestrutural, pôde-se observar a angulação entre as suturas das conchas das três espécies, nos exemplares analisados. A angulação foi discreta em *B. glabrata* e marcante em *B. tenagophila*, principalmente nas duas últimas voltas, demonstrando claramente a carena. Esta característica na concha de *B. tenagophila* está presente em diversas literaturas específicas como Paraense (1975, 2008), Barbosa (1995) e MS (2008) e permite o depósito de matéria orgânica próxima às suturas, podendo servir de microambiente para outros organismos.

A angulação presente nas últimas voltas em *B. straminea* foi citada por Souza; Lima (1990) como leve, mas em nosso estudo, observou-se que a angulação foi marcante, com um aumento significativo no diâmetro da última volta da concha.

Outro aspecto importante observado na análise ultraestrutural foram as linhas de crescimento, marcas do ritmo de crescimento do animal no ambiente. Essas marcas foram discretas em *B. glabrata* e bem marcantes em *B. tenagophila* e *B. straminea*. Nesta última espécie, verificou-se que uma linha de crescimento marcante foi observada antes do último giro da concha. Este fato

pode ser observado também na figura da concha apresentada por Souza e Lima (1990), apesar das autoras não terem descrito esta característica. Acreditamos tratar de um indicador de início da maturidade sexual. Segundo MS (2008), ritmo de crescimento de moluscos do gênero *Biomphalaria* são parecidos. No entanto, as marcas nas conchas demonstram estratégias diferentes de ritmos de crescimento, e a possibilidade de que essas estratégias estejam associadas às relações com o ambiente e a uma “memória evolutiva”, o que carece de maiores estudos. O desgaste observado nas conchas das três espécies em nosso estudo pode estar relacionado ao movimento de arrastar descrito por Jurberg *et al.* (1987), onde a massa cefalopédica move-se para frente, deixando o colo exposto e posteriormente a concha é puxada para frente, cobrindo o colo. Neste movimento, a concha arrasta no substrato, provocando danos, principalmente no perióstraco, a camada mais externa e fina das conchas destas espécies. Estes últimos autores descreveram que a presença de bactérias, fungos e outros microorganismos podem provocar também o desgaste do perióstraco. Eles salientaram que este desgaste pode ser observado nas partes mais antigas da concha, pelo fato de a camada ser fina e velha. O desgaste no umbigo foi observado em nosso estudo em todas as conchas, corroborando com estes autores. Este fato foi potencializado nos moluscos coletados no campo. O desgaste das conchas desses animais está também associado à predação e as outras possíveis relações simbióticas realizadas por estes animais em campo, servindo de fonte de cálcio para outras espécies. A disponibilidade de cálcio no ambiente interfere no desgaste da concha (Silva *et al.*, 2017), pois torna a mesma mais fina, sendo mais facilmente desgastada.

O carbonato de cálcio é formado pelos elementos Ca, C e O, que formam a base estrutural das conchas dos moluscos (Marxen; Becker, 1997; Marxen *et al.*, 1998) e estão presentes de forma abundante, com maior percentagem em todas as conchas. O Ca é amplamente encontrado na natureza tendo como principal fonte as rochas sedimentares calcárias, logo, assim como foi encontrado em nosso estudo, os moluscos coletados em campo apresentam uma maior concentração de cálcio nas conchas devido a maior disponibilidade desse elemento no ambiente. A diferença na concentração de cálcio encontrada nas conchas de campo e de laboratório deve-se à capacidade de algumas espécies de mobilizar o cálcio da hemolinfa para a concha e vice-versa, conforme a quantidade desse

elemento no ambiente (Magalhães; Pinheiro; Mello-Silva, 2011). Além disso, como visto por Silva *et al.* (2017), a quantidade de cálcio disponível no ambiente interfere no metabolismo desses moluscos. Nossos resultados destacam a diferença significativa de cálcio entre a camada inorgânica e orgânica das conchas de animais não infectados dos grupos de laboratório e de campo, o que evidencia a presença dos cristais de cálcio na camada logo abaixo do perióstraco, a camada prismática.

O elemento nitrogênio (N) nas conchas das três espécies como um dos elementos mais abundante está relacionado com a presença de proteínas na matriz orgânica, ou seja, no perióstraco descrita para *B. glabrata* por diferentes autores (Hasse *et al.*, 2000; Marxen *et al.*, 1998, 2003). As médias das concentrações de nitrogênio no perióstraco das populações de campo foram menores que as populações de laboratório, demonstrando diferença significativa principalmente entre os exemplares de *B. glabrata* e *B. tenagophila* nesses dois ambientes. Acredita-se que a concha não seja apenas uma estrutura, mas sim um órgão importante para a manutenção da homeostase dos moluscos, visto que participa da mobilização de cálcio, além de apresentar proteínas análogas às proteínas de ossos humanos como a dermatopontina. Este órgão precisa de mais estudos, uma vez que como os moluscos no campo estão mais expostos a disruptores fisiológicos e maior concentração de matéria orgânica, pode ser que as proteínas presentes na matriz orgânica tenham um papel importante no desencadeamento da resposta imune também como o cálcio.

Os animais do campo estão expostos a todo o tipo de contaminação e alterações ambientais, o que os levam ao constante e inevitável contato com elementos químicos que estejam dissolvidos naquele habitat. Nesse contexto, espécies de *Biomphalaria* têm sido analisadas quanto a capacidade de bioacumulação de metais pesados e possíveis alterações metabólicas devido ao contato com herbicidas e moluscidas, o que lhes confere o caráter de bons indicadores de contaminação ambiental (Mahamoud; Abu Taleb, 2013; Lima *et al.* 2012). O ferro, o fósforo e o silício compõem quimicamente diversos agrotóxicos e fertilizantes, e em paralelo a isso, nossos resultados demonstram diferença significativa desses elementos nas conchas coletadas no campo. O ferro e o fósforo são componentes químicos que compõe agrotóxicos inorgânicos que, assim como os demais tipos, agem direta ou indiretamente na morte ou controle de organismos vivos (Jardim; Andrade; Queiroz, 2009). O ferro é naturalmente

encontrado na hemoglobina que compõe a hemolinfa de *Biomphalaria* spp. (Souza; Lima, 1990; Barbosa, 1995; Paraense, 2008) porém, também é um metal pesado que tende a bioacumular em diversos organismos. O fósforo é um elemento que apresenta função essencial para plantas e animais, principalmente no que se refere a compostos moleculares (Westheimer, 1987). Devido a isso, tem sido muito utilizado como fertilizante na produção agrícola (Ashley; Cordell; Mavinic, 2011). O silício é um ametal que também tem sido utilizado para o controle de insetos-praga (Gomes *et al.*, 2009; Scholz; Wellmer, 2013), o que justifica, em conjunto com o ferro e o fósforo, o encontro desses elementos nas conchas de campo.

Ao relacionarmos os elementos químicos citados e as áreas de coleta, é válido ressaltar que o ponto de coleta em Paracambi/RJ era uma área urbanizada, com moradias ao redor de um pequeno córrego, com despejo de esgoto doméstico, onde foram encontrados os espécimes de *B. straminea*. O ponto de coleta em Jacarepaguá/RJ também estava localizado em uma área urbanizada, com indícios de despejo de esgoto. Já as áreas de coleta em Sumidouro/RJ foram predominantemente rurais e próximas a regiões de plantio, onde em alguns pontos foi possível sentir um forte cheiro de agrotóxico. Além disso, nos corpos d'água onde foram encontrados os espécimes de *B. glabrata*, a água se mantinha represada, sem um fluxo corrente.

O programa para a promoção da fluoretação da água de abastecimento foi desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e preconizada por diversos países e outras organizações de saúde e ciência (Zimmer; Jahn; Barthel, 2003). Apesar disso, o flúor apresenta toxicidade aguda quando ingerido em excesso, podendo acarretar no desenvolvimento ou agravamento de osteoporose (Santos *et al.*, 2017). Em nosso estudo foi evidenciada a presença de flúor na maioria das conchas, em consequência do ambiente em que se encontram. Nesse estudo, não foi observada relação entre a quantidade de flúor e de cálcio nas conchas. Destaca-se o fato das conchas de laboratório de *B. glabrata* apresentarem concentração significativamente maior desse elemento em relação às outras duas espécies, também de populações criadas em laboratório. Esse fato, assim como em outros elementos químicos, ressalta a hipótese de que cada espécie apresenta expressão metabólica individualizada, o que a faz ter um fenótipo químico específico.

É notória a ampla aplicabilidade e estudos do NIR em diversas áreas, principalmente médica e econômica. Porém, ao relacionarmos com a biodiversidade e, mais especificamente, com moluscos, a quantidade de estudos diminuiu consideravelmente. Essa escassez de pesquisas na área associada à utilidade do espectrofotômetro NIR, nos levou a realizar análises de moluscos límnicos (Mello-Silva *et al.*, 2015), o que tem intensificado o uso desse equipamento principalmente nas três espécies de *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil.

Mediante este fato, foi necessário padronizar o uso do NIR em espécies do gênero *Biomphalaria*. Para tanto, seguimos algumas recomendações (Vance *et al.*, 2016) e orientações de diferentes trabalhos com outros invertebrados, como mosquitos (Sikulu *et al.*, 2014; Sikulu-Lord *et al.*, 2016) e moluscos bivalves (Fluckiger *et al.*, 2011). A quantidade de amostras tem uma influência direta com a criação de um modelo de classificação robusto e significativo. Quanto maior e de mais variadas populações de espécimes o modelo for, melhor será a sua calibração e validação (Vance *et al.*, 2016), devido às diferenças fenotípicas intra e interespecíficas.

Analisar os moluscos vivos foi um teste pioneiro realizado pelo nosso grupo, pois experimentos utilizando gastrópodes vivos usando o NIR ainda não tinham sido realizados. Trabalhos anteriores não utilizaram animais vivos, mas sim congelados, como insetos (mosquitos) (Sikulu *et al.*, 2016) e moluscos bivalves (Fluckiger *et al.*, 2011) e são escassos na literatura. No entanto, estes autores não avaliaram a sobrevivência do animal após a passagem pelo NIR. Em nosso experimento, observou-se que todos os moluscos que passaram pelo NIR sobreviveram, o que demonstra que o feixe óptico do espectrofotômetro NIR que incide sobre o molusco não influencia negativamente suas funções vitais. Eles continuaram vivos e eliminando massas ovígeras.

As análises intraespecíficas realizadas enfatizam a influência que o ambiente externo tem sobre o metabolismo das espécies de organismos aquáticos. Variadas condições podem ter influenciado a diferenciação encontrada entre exemplares da mesma espécie que foram coletados em campo e criados em laboratório. Nossos resultados demonstraram que, dentre as três espécies estudadas, *B. glabrata* apresentou a separação intraespecífica mais evidente (85%). Esse fato expressa que a mesma espécie encontrada em campo

e criada em laboratório apresentam metabolismo diferente, que está associado às alterações metabólicas causadas por fatores ambientais. Neste estudo, a população de *B. glabrata* foi coletada no município de Sumidouro, região que tem a agricultura convencional como um de seus pilares econômicos e, por isso, os agrotóxicos são frequentemente usados (Stotz, 2012). Esse tipo de contaminante químico tem a capacidade de causar alterações nos sistemas reprodutivo, ser antioxidante, citotóxico e genotóxico para as espécies desse gênero (Lima et al., 2018; Ibrahim; Sayed, 2019). Além disso, certos portadores moleculares de informação epigenética são sensíveis às condições ambientais em que os moluscos estão expostos, representando uma característica chave para o seu desenvolvimento (Fallet *et al.* 2019). A diferenciação intraespecífica das três espécies pode ter sido influenciada por alterações epigenéticas produzidas em resposta ao ambiente em que esses animais se encontram e podendo ser transmitida a futuras gerações, necessitando de estudos mais profundos.

Em relação às análises interespecíficas, os resultados demonstraram ser possível separar as três espécies hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, usando moluscos vivos através o FT-NIR, tanto em populações oriundas do campo, quanto aquelas mantidas em laboratório. Os erros de classificação foram evidenciados entre os espécimes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* demonstrando que os fenótipos químicos das espécies estão mais próximos. Este fato pode estar relacionado às semelhanças morfológicas e biológicas destas espécies, além da possibilidade de algumas destas populações se cruzarem (Mello-Silva *et al.*, 1998). No entanto, Vidigal *et al.* (2000), usando um marcador de diferenciação genética (ITS2), demonstraram que *B. glabrata* e *B. tenagophila* estão em clados diferentes, o que representa relativa distância genética entre elas.

A possibilidade de usar os conteúdos de glicogênio nos tecidos para construir modelos de calibração que diferenciam essas estruturas pela predição da quantidade destes conteúdos, já foi realizada com outros moluscos, como os bivalves, usando o NIR. Estes estudos estão relacionados a qualidade alimentar dos moluscos, demonstrando variação nos conteúdos de glicogênio em função do acondicionamento da massa visceral de indivíduos da mesma espécie. Os autores utilizaram modelos de calibração para predizer as concentrações de glicogênio, analisadas através do método padrão (Fluckiger *et al.*, 2011)

Ressalta-se ainda que os acertos foram maiores em *B. tenagophila* e *B. straminea*, que apresentam características biológicas peculiares e adaptadas a um determinado tipo de ambiente. Estas adaptações podem ser expressas em características metabólicas que foram detectadas pelo NIR.

A utilização do NIR com moluscos vivos é viável, mas torna-se necessário analisar os dados em função do ambiente, pois o mesmo interfere no fenótipo químico do animal. Apesar da possibilidade de diferenciar as espécies de campo, há necessidade de ampliar os estudos para diferentes biótopos. A ferramenta NIR pode auxiliar os estudos complementares da taxonomia clássica, como um fenótipo químico, levando em consideração as possíveis alterações epigenéticas dos moluscos à exposição em ambientes poluídos.

As conchas, segundo os taxonomistas, podem ser utilizadas como um dos caracteres morfológicos de diferenciação das espécies. No entanto, é necessária também a dissecação e a caracterização de algumas estruturas do aparelho reprodutor e excretor para o diagnóstico taxonômico (Paraense, 2008). Os resultados demonstraram que há uma variação interespecífica entre as conchas das espécies de *Biomphalaria* analisadas. Estes resultados tornam-se interessantes sob diversos aspectos como: possibilidade de composição diferentes das conchas; a participação direta das conchas no metabolismo do molusco e a preservação das conchas ao longo do tempo.

Estudos com relação as conchas de *Biomphalaria* são restritos a formação e composição das conchas de *B. glabrata* (Marxen; Becker, 1997; Marxen *et al.*, 1998; Marxen *et al.*, 2003; Hasse *et al.*, 2000). Considerando que as conchas são um reflexo das projeções metabólicas do animal, as três espécies apresentam características biológicas e fisiológicas distintas entre si, possivelmente o arranjo químico e proteico nas matrizes das conchas desses animais apresenta-se de forma diferente. Devido aos compostos orgânicos serem ricos em ligações covalentes, principalmente proteínas e lipídios, as classificações obtidas no NIR, através dos nossos resultados, estão provavelmente relacionadas a constituição da matriz orgânica das conchas.

Outra questão com relação às variações observadas nos resultados conquiliológicos, é que as conchas vão além das funções básicas já conhecidas nos moluscos. As conchas de *Biomphalaria* spp. participam diretamente da regulação do metabolismo de cálcio (Magalhães; Pinheiro; Mello-Silva, 2011).

Em estudo observando a participação de cálcio exógeno no metabolismo de carboidratos de *B. glabrata* (Silva *et al.*, 2017), pode-se afirmar que ele influencia a fisiologia do animal e conseqüentemente o resultado do processo metabólico. Assim como ocorre com o cálcio, outras substâncias do ambiente também podem ser mobilizados para o organismo e deste para a concha de formas diferentes conforme a espécie, podendo justificar a diferenciação das mesmas, usando somente as conchas.

Quanto ao diagnóstico parasitológico, usando o NIR, Sikulu-Lord *et al.* (2016) verificaram a diferenciação de mosquitos *Aedes aegypti* com a endossimbiose por *Wolbachia* spp., enquanto Fernandes *et al.* (2018) observaram a diferenciação de *A. aegypti* não infectados dos infectados por Zika vírus, e Maia *et al.* (2019) realizaram o diagnóstico parasitológico de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados por *Plasmodium falciparum*.

O sucesso da diferenciação dos moluscos infectados está baseado no perfil metabólico distinto dos animais frente a infecção. Essa, assim como o jejum, altera significativamente os conteúdos de glicogênio nos tecidos e sua disponibilidade na hemolinfa (Becker, 1983; Livingstone; Zwaan, 1983; Mello-Silva *et al.*, 2010, 2011; Pinheiro, 2007). A espécie *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* reduz os conteúdos de glicogênio nos tecidos, chegando a ficar a níveis não detectáveis com os métodos bioquímicos, associados a eliminação de cercária pelos moluscos (Mello-Silva *et al.*, 2010). Outra alteração está associada aos produtos nitrogenados de excreção, devido a alteração no ciclo da ureia, proporcionada pela ingestão de arginina pelos esporocistos secundários para o desenvolvimento de cercárias intramolusco (Pinheiro, 2007; Mello-Silva *et al.*, 2011). A diferenciação parasitológica, do período pós-triagem, usando o FT-NIR foi realizada quando os moluscos estavam eliminando cercárias, logo, é provável que esta diferenciação deva ter ocorrido devido a estas alterações metabólicas.

A baixa taxa de classificação de acertos (40%) do modelo de classificação do grupo pré-triagem, em que todos os caramujos foram expostos à infecção, porém nem todos obtiveram eliminação de cercária, demonstra a significativa relação parasito-hospedeiro em que muitas vezes é subestimada. Após 24h de infecção já é possível identificar alterações imunológicas, proteômicas e metabólicas sofridas pelo caramujo *B. glabrata* (Mendes *et al.*, 2019), e a partir

desse momento, durante todo o processo de infecção, observa-se uma corrida imunológica entre *B. glabrata* e *S. mansoni*, em que ambos se utilizam de mecanismos subjacentes de fracasso ou sucesso do desenvolvimento da infecção que são multigênicos e variáveis (Coustau *et al.*, 2015). Logo, podemos considerar que alguns dos animais expostos e negativos, passaram pelas mesmas alterações imunológicas, proteômicas e metabólicas que os caramujos positivos, pelo fato de terem sido expostos à presença do parasito, o que levou a uma maior semelhança entre os espectros obtidos pelo FT-NIR no período anterior à triagem.

## 7 CONCLUSÕES

- A descrição morfológica ultraestrutural das conchas de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, provenientes do campo e de laboratório, foi realizada evidenciando as características das linhas de crescimento, a presença ou ausência de perióstraco, desgaste das conchas, a diferença entre a camada prismática de cada uma delas, angulação entre as suturas, indicando a presença de carena em *B. tenagophila*, e em menor intensidade nas conchas de *B. straminea*;
- Os elementos químicos primordiais da composição da concha (C, O, Ca e N) foram observados em todas as três espécies no umbigo e na última volta das conchas. As conchas das populações de campo apresentaram maior variedade de elementos químicos quando comparadas às de laboratório. Elementos químicos como ferro, silício e fósforo, relacionados principalmente ao uso de agrotóxicos e fertilizantes, foram encontrados em maior quantidade nas conchas provenientes do campo, principalmente em *B. glabrata*;
- Utilizando exemplares vivos, as três espécies de *Biomphalaria* foram diferenciadas através do FT-NIR;
- A diferenciação intraespecífica de espécimes vivos, provenientes do campo e de laboratório, evidenciou que o ambiente pode influenciar nas alterações epigenéticas desses moluscos, expondo que indivíduos da mesma espécie criados em locais diferentes, podem apresentar fenótipo químico distinto.

- O uso da técnica NIRS apresentou variação interespecífica entre as conchas das espécies de *Biomphalaria* oriundas do campo e de laboratório, o que ressaltou a possibilidade de composição diferente das conchas.
- Foi possível criar e validar um modelo espectrofotométrico para o diagnóstico parasitológico de *B. glabrata* infectada experimentalmente com *S. mansoni*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. S.; MENESCAL, A. K. B.; SILVA, M. A.; SANTOS, J. J.; PARANAGUÁ, M. N. Moluscos utilizados na confecção de zooartesanatos comercializados no litoral de Pernambuco. **Resumos do 24º Congresso Brasileiro de Zoologia**, Itajaí, Brasil, p. 55. 2002.
- ANDRUS, C. F. T. Shell midden sclerochronology. **Quaternary Science Reviews**. v. 30, n. 21-22, p. 2892 – 2905, 2011.
- ASHLEY, K.; CORDELL, D.; MAVINIC, D. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. **Chemosphere**. v. 84, n. 6, p. 737-746, 2011.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 314 p., 1995.
- BECKER, W. Purine metabolism in *Biomphalaria glabrata* under starvation and infection with *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76 B, p. 215-219, 1983.
- BEZERRA, F. S. de M. Moluscos transmissores do *Schistosoma mansoni*. In: NEVES, P. D.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, L. W. A. **Parasitologia humana 11ª ed.** Editora Atheneu. cap. 23, p. 213-222, 2004.
- BROWN, M. Rapid compositional analysis of oysters using visible-near infrared reflectance spectroscopy. **Aquaculture**, v. 317, p. 233-239, 2011.
- BROWN, L. E.; DOOLE R.; MALFAIT, N. The role of motor learning in spatial adaptation near a tool. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. Filo Mollusca. In: \_\_. **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2ª ed, cap 20, p. 731-804, 2007.
- CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1124 p, 2008.
- CIURCZAK, E. W. Near-Infrared Spectroscopy. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 47, p. 157-176, 2006.
- COMPÈRE JR, E. L.; BATES, J. M. Determination of calcite: aragonite ratios in mollusc shells by infrared spectra. **Lymnology and Oceanology**, v. 18, p. 326-331, 1972.

COSTA NETO, E. M. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica. **Biotemas**. v. 19, n. 3, p. 71-78, 2006.

COURA, J. R.; Amaral, R. S. **Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic areas**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, p. 13-19, 2004.

COUSTAU, C.; GOURBAL, B.; DUVAL, D.; YOSHINO, T. P.; ADEMA, C. M.; MITTA, G. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: a review of research progress over the last decade. **Fish Shellfish Immunol**. v. 46, p. 5 – 16, 2015.

DEPICKERE, S.; RAVELO-GARCÍA, A. G.; LARDEUX, F. Chagas disease vectors identification using visible and near-infrared spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 197, 2020.

DESPOMMIER, D.; GWADZ, R.; HOTEZ, P. J.; KNIRSCH, C. **Parasitic Diseases**. 5<sup>th</sup>ed. New York: Apple Trees Productions, 2005.

DAUPHIN, Y.; DENIS, A. Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126 p. 367–377, 2000.

DAUPHIN, Y.; BALL, A. D.; COTTE, M.; CUIF, J. P.; MEIBOM, J.; SALOMÉ, M.; SUSINI, M.; WILLIAMS, C. T. Structure and composition of the nacre–prisms transition in the shell of *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). **Anal Bioanal Chem**, v. 390, p. 1659–1669, 2008.

E-KOBON, T.; THONGARARM, P.; ROYTRAKUL, S.; MEESUK, L.; CHUMNANPUEN, P. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cell from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 49-57, 2015.

FALLET, M.; LUQUET, E.; DAVID, P.; COSSEAU, C. Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks. **Gene Gene**, 2019.

FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORREA LDOS, R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; DE SOUZA, S.; DE ANDRADE, Z.; JUNIOR, A. M. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol**. V. 134, p. 228–234, 2013.

FERNANDES, J. N.; DOS SANTOS, L. M. B.; CHOUIN-CARNEIRO, T.; PAVAN, M. G.; GARCIA, G. A.; DAVID, M. R., BEIER, J. C., DOWELL, F. E.; MACIEL-DE-FREITAS, R. SIKULU-LORD, M. T. Rapid, non-invasive detection of Zika virus in mosquitoes by near-infrared spectroscopy. **Science Advances**, v. 4, 2018.

FLUCKIGER, M.; BROWN, M. R.; WARD, L. R.; MOLTSCHANIWSYJ, N. A. Predicting glycogen concentration in the foot muscle of abalone using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1817-1820, 2011.

FURUHASHI, T.; SCHWARZINGER, C.; MIKSIK, I.; SMARZ, M.; BERAN, A. Molluscan Shell evolution with review of shell calcification hypothesis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 154, p. 351-371, 2009.

GAUME, B.; FOUCHEREAU-PERON, M.; BADOU, A.; HELLÉOUET, M. N.;

HUCHETTE, S.; AUZOUX-BORDENAVE, S. Biomineralization markers during early shell formation in the European abalone *Haliotis tuberculata*, Lymnaeus. **Marine Biology**, v. 158, p. 341-353, 2011.

GIANNELLI, A.; CANTACCESSI, C.; COLELLA, V.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Gastropod-Borne Helminths: a Look at the Snail-Parasite Interplay. **Trends Parasitol.** V. 32, p. 255–264, 2016.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; NERI, D. K. P. Adubação com silício como fator de resistência a insetos-praga e promotor de produtividade em cultura de batata inglesa em sistema orgânico. **Ciênc. agrotec.** v.33, n.1, p.18-23, 2009.

GUILLOU, F.; ROGER, E.; MONE, Y.; ROGNON, A.; GRUNAU, C.; THERON, A.; MITTA, G.; COUSTAU, C.; GOUBAL, B. E. F. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Mol Biochem Parasitol**; v. 155: p. 45 - 56, 2007.

HASSE, B.; EHRENGERG, H.; MARXEN, J. C.; BECKER, W.; EPPLE, M. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **European Journal of Chemistry.** v. 6, n. 20, 2000.

HOSHI, K.; EJIRI, S.; OZAWA, H. Organic components of crystal sheaths in bone. **J. Electron Microsc.** v. 50, n. 1, 33-40. 2001.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 300, 2008.

IBRAHIM, A. M.; SAYED, D. A. Toxicological impact of oxyfluorfen 24% herbicide on the reproductive system, antioxidant enzymes, and endocrine disruption of *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) snails. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. de A.; QUEIROZ, S. C do N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, 996 – 1012, 2009.

JI-YONG, S.; XIAO-BO, Z.; JIE-WEN, Z.; HOLMES, M.; KAI-LIANG, W.; XUE, W. **Determination of total flavonoids content in fresh Ginkgo biloba leaf with different colors using near infrared spectroscopy. Spectrochimica Acta**, v. 94, p. 271-276, 2012.

JURBERG, P.; SCHALL, V. T.; BARBOSA, J. V.; GATTI, M. J.; SOARES, M. S. Behavior of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*, at different depths in water in laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 197-208, 1987.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.33, n.3, p. 303-308, 2000.

LI, J.; ZHANG, Y.; CAI, W.; SHAO, X. Simultaneous determination of Mercury, lead and cadmium ion in water using near infrared spectroscopy with preconcentration by Thiol-functionalized magnesium phyllosilicate clay. **Talanta**, v. 84, p. 679-683, 2011.

LIMA, M. C. de. A importância sócio-econômica, cultural e ambiental do sururu (*Mytella charruana*) na terra de Alagoas: como se valorar esse recurso à luz de princípios da economia ecológica? **Revista Incelências**. v. 4, n. 1, 2015.

LIMA, M. de V.; SIQUEIRA, W. N. de; SILVA, H. A. M. F.; LIMA FILHO, J. de M.; FRANÇA, E. J. De; MELO, A. M. M. de A. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.

LIMA, M. G.; AUGUSTO, R. de C.; VASCONCELLOS, M. C. de, MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milii* solution versus times of preparation. **Journal of Natural Products**, v. 5, 222-232, 2012.

LIVINGSTONE, D.; ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism of Gastropods. In PW Hochachka. **The Mollusca: Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics**. Academic Press. London, Vol. 1, p. 177- 242, 1983.

LUZ, E. R. **Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados parciais**. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, p. 109, 2003.

MACHADO-SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. In: CARVALHO, O. C.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap.2, p. 43-85, 2008.

MADIGAN, T.; KIERMEIER, A.; LOPES, M. B.; COZZOLIN, D. The Effect of Homogenisation and Storage on the Near-Infrared Spectra of Half Shell Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). **Food Anal Methods**, v. 5, p. 995–1002, 2012.

MAIA, M. F.; KAPULU, M.; MUTHUI, M.; WAGAH, M.G.; FERGUSON, H. M; DOWELL, F. E.; BALDINI, F.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. Detection of *Plasmodium falciparum* infected *Anopheles gambiae* using near-infrared spectroscopy. **Malaria Journal**. v. 18, 2019.

MAGALHÃES, A. C.; PINHEIRO, J.; MELLO-SILVA, C. C. A mobilização do cálcio em *Biomphalaria glabrata* exposta a diferentes quantidades de carbonato de cálcio. **Revista de Patologia Tropical**. V. 40, n.1, p. 46-55, 2011.

MAHAMOUD, K. M. A.; ABU TALEB, H. M. A. Fresh water snails as bioindicator for some heavy metals in the aquatic environment. **African Journal of Ecology**, v. 51, 193-198, 2013.

MARXEN, J. C.; BECKER, W. The Organic Shell Matrix of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 118B, n. 1, p. 23-33, 1997.

MARXEN, J. C.; HAMMER, M.; GEURKE, T.; BECKER, W. Carbohydrates of organic Shell matrix and the Shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say). **Biological Bulletin**, v. 194, p. 231-240, 1998.

MARXEN, J. C.; NIMTZ, M.; BECKER, W.; MANN, K. The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is a N-glycosylated dermatopontin. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1650. p. 92-98, 2003.

MELDRUM, F. C., Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. **Int.**

**Mater. Rev.** v. 48, n.3, p. 187-224, 2003.

MELLO-SILVA, C. C.; GRAULT, C. E.; BARBOSA, F.S; COSTA, V. A. . Possible hybridization of Brazilian Planorbid snails and its importance in population dynamics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 227-232, 1998.

MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M. M.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. de A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* látex. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 492-495, 2010.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; B.; RODRIGUES, M. L. A.; J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta. Tropica**, v. 117, p. 101-104, 2011.

MELLO-SILVA, C. C.; THIENGO, S.; FERNANDEZ, M. A.; VIDAL, C.; PASQUINI, C. NIR and hyperspectral imaging in the diagnosis of the snails intermediate hosts of Schistosomiasis in Brazil. **In: 17th International Conference on Near infrared spectroscopy**. Foz do Iguaçu - PR, 2015.

MENDES, T. M. F.; CARRILHO, E.; AFONSO, A. J. P. F. S.; GALINARO, C. A.; CABRAL, F. J.; ALLEGRETTI, S. M. Proteomic, metabolic and immunological changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, 2019.

MONE, Y.; GOURBAL, B.; DUVAL, D.; DU PASQUIER, L.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; MITTA, G. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. **PLoS Negl Trop Dis**; 4, 2010.

MORAES, N. S.; BRAVIN, A. A Influência e a importância dos moluscos na história e desenvolvimento das raças. **Resumos do 2º Simpósio Brasileiro de Etnobiologia e Etnoecologia**, São Carlos, Brasil, p. 87, 1998.

M.S. - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 178 p, 2008.

MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 144 p, 2014.

NOMURA, H. **Os moluscos no folclore**. Departamento Estadual de Imprensa, Natal, Brasil, 78 p. 2000.

NUDELMAN, F.; GOTLIV, B. A.; ADDADI, L.; WEINER, S. Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. **Journal of Structural Biology**. v. 153, p. 176-187, 2006.

NUDELMAN, F. Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal

- nucleation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 46, p. 2-10, 2015.
- PARAENSE, W. L. Shell versus anatomy in planorbid systematics. I: *Australorbis glabratus*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 21, p. 163-170, 1961.
- PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA, J. W. **Introdução à Geografia Médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blucher & USP. p. 213-239, 1972.
- PARAENSE, W. L. Estudo atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**. v. 55, p. 105-128, 1975.
- PARAENSE, W. L. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 36, p. 535-539, 1976.
- PARAENSE, W.L. Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 285-308. 2008.
- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives – A review. **Analytica Chimica Acta**, 1026, 8-36, 2018.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. CENGAGE Learning, 2010.
- PAULA, S. M.; SILVEIRA, M. Studies on molluscan shells: contributions from microscopic and analytical methods. Review. **Micron**, v. 40, p. 669-690, 2009.
- PETRONE, L.; RAGG, L. C. N.; McQUILLAN, A. J. In situ infrared spectroscopic investigation of *Perna canaliculus* mussel larvae primary settlement. **Biofouling**, v. 24, p. 405-413, 2008.
- PILA, E. A.; TARRABAIN, M.; KABORE, A. L., HANINGTON, P. C. A Novel TollLike Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**. v. 12, n. 3. E-1005513, 2016.
- PINHEIRO, J. Alterações fisiológicas nas interações entre larvas de trematódeos e seu primeiro hospedeiro intermediário - moluscos. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; F, M. A.; A, R. S. **Tópicos em malacologia**. Ecos dos XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia. Editora Sociedade Brasileira de Malacologia, v.18, p. 365, 2007.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2020. URL <https://www.R-project.org/>.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 4<sup>o</sup> ed. 2008.
- ROGGO, Y.; PASCAL, C.; LENE, M.; CARMEN, L.; AURÉLIE, E; NADINE, J. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683–700, 2007.
- RONECKER, J. P. **O simbolismo animal: mitos, crenças, lendas, arquétipos, folclore, imaginário**. Paulus, São Paulo, Brasil, 389 p. 1997.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZS, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2010.

SANTOS, C. C. L.; BEZERRA, R. M.; OLIVEIRA, A. B. M. de; FIGUEIREDO, C. G. G. De. Fluorose esquelética em idosos: uma revisão sistemática. In: **V Congresso Internacional de Envelhecimento Humano**. 2017.

SCHOLZ, R. W.; WELLMER, F. W. Approaching a dynamic view on the availability of mineral resources: What we may learn from the case of phosphorus? **Global Environmental Change**, v. 23, n. 1, p. 11-27, 2013.

SIKULU, M. T.; MAJAMBERE, S.; KHATIB, B. O.; ALI, A. S.; HUGO, L. E.; DOWELL, F. E. Using a near-infrared spectrometer to estimate the age of *Anopheles* mosquitoes exposed to pyrethroids. **PLOS one**, v. 9, 2014.

SIKULU-LORD, M. T.; MAIA, M. F. MILALI, M. P.; HENRY, M.; MKANDAWILE, G.; KHO, E. A.; WIRTZ, R. A.; HUGO, L. E.; DOWELL, F. E.; DEVINE, G. J. Rapid and Non-destructive Detection and Identification of Two Strains of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* by Near-Infrared Spectroscopy. **PLoS**, p. 1-12, 2016.

SIKULU-LORD, M. T.; DEVINE, GREGOR J.; HUGO, LEON E.; DOWELL, FLOYD E. First report on the application of near-infrared spectroscopy to predict the age of *Aedes albopictus* Skuse. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

SILVA, L. D.; AMARAL, V. C. S.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M.; REZENDE, H. H. A.; SANTOS, D. B.; MELLO-SIVA, C. C.; BEZERRA, J. C. B. Changes in energetic metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) in response to exogenous calcium. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 304-311, 2017.

SIMONE, L. R. L. Mollusca. In: MIGOTTO, A.; TIAGO, C.G. **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp. Cap 19. p. 130-136 , 1999.

SIMONE, L. R. L. Estudos de morfologia detalhada e de filogenia em moluscos: uma análise comparativa. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A.D.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M. A.; ABSALÃO, R. S. **Tópicos em Malacologia: Ecos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia. Parte II, cap 4, p. 189-202, 2007.

SKINGSLEY, D. R.; WHITE, A. J.; WESTON, A. Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy. **Journal of Molluscan Studies**, v. 66, p. 363-371, 2000.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: Fiocruz/CPqRR, n.1, 75 p. 1990.

STOTZ, E. N. Os limites da agricultura convencional e as razões de sua persistência: estudo do caso de Sumidouro, RJ. **Rev. bras. Saúde ocup**, 37:114-126, 2012.

SUZUKI, M.; NAGASAWA, H. Mollusk Shell structures and their formation mechanism. **Canadian Journal of Zoology**. v. 91, p. 349-366, 2013.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; BOAVENTURA, M. F.; GRAULT, C. E.; SILVA, H. F. R. MATTOS, A. C.; SANTOS, S. B. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan Mesoregion. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 96, p.177-184, 2001.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; BOAVENTURA, M. F.; SANTOS, S. B.; MATTOS, A. C. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansonii in the State of Rio de Janeiro, Brazil: II – Centro Fluminense Mesoregion. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 97, n. 5, p. 621-626, 2002.

THIENGO, S. C. Helminthoses de interesse médico-veterinário transmitidas por moluscos no Brasil. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; ABSALÃO, R. S. **Tópicos em Malacologia: Ecos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia. cap 7, p. 287-294, 2007.

TOLEDO-PIZA, A. R. DE; FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; GIUSEPPINA, N.; NAMIIYAMA, G.; TONELOTTO, M.; VILLAR, K. de S.; ROFATTO, H. K.; MENDONÇA, R. Z. The antiviral effect of mollusc mucus on measles virus. **Antiviral Research**, v. 134, p. 172 – 181, 2016.

TOLEDO-PIZA, A. R. DE; OLIVEIRA, M. I. DE; NEGRI, G.; MENDONÇA, R. Z.; FIGUEIREDO, C. A. Polyunsaturated fatty acids from *Phyllocaulis boraceiensis* mucus block the replication of influenza virus. **Archives of Microbiology**, 2018.

VANCE, C. K.; TOLLESON, D.; KINOSHITA, K.; RODRIGUEZ, J.; FOLEY, W. J. Review  
Near infrared spectroscopy in wildlife and Biodiversity. **Journal Near Infrared Spectroscopy**, v. 24, p. 1–25, 2016.

VIDIGAL, T.; KISSINGER, J. C.; CALDEIRA, R. L.; PIRES, E. C. R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A. J. G. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**, v. 121, p. 611-620, 2000.

WU, X. J.; SABAT, G.; BROWN, J. F.; ZHANG, M.; TAFT, A.; PETERSON, N.; HARMS, A.; YOSHINO, T. P. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 164: p. 32 – 44, 2009.

WESTBROEK, P.; MARIN, F. A marriage of bone and nacre. **Nature**. v. 392, p. 861-862, 1998.

WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**. v. 235, n. 4793, p. 1173-1178, 1987.

WYSOKOWSKI, W.; ZATON, M.; BAZHENOV, V. V.; BEHM, T.; EHRLICH, A.; STELLING, A. L.; HOG, M.; EHRLICH, H. Identification of chitin in 200-million-year-old fastropod egg capsules. **Paleobiology**, v. 40, p. 529-540, 2014.

ZIMMER, S.; JAHN, K. R.; BARTHEL, C. R. Recommendations for the use of fluoride in caries prevention. **Oral Health Prev Dent.**, v.1, n. 1, 45-51, 2003.