

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MALACOLOGIA DE  
VETORES

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIONÔMICOS, FÍSICOS E QUÍMICOS NA  
CRIAÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPOSTOS A DIFERENTES  
TIPOS DE ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATOS.

WALTER CÉSAR GÓES VALENTE

Orientadora: DRA. MARTA JULIA FARO DOS SANTOS COSTA

Co- orientadora: DRA. GIULIANA VIEGAS SCHIRATO

Rio de Janeiro

2021

WALTER CÉSAR GÓES VALENTE

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIONÔMICOS, FÍSICOS E QUÍMICOS NA  
CRIAÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPOSTOS A DIFERENTES  
TIPOS DE ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATOS.

Monografia apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Especialização Lato sensu em  
Malacologia de Vetores, Instituto Oswaldo Cruz,  
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador (a): Marta Julia Faro dos Santos Costa

Rio de Janeiro

2021

Valente, Walter César Góes.

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIONÔMICOS, FÍSICOS E QUÍMICOS NA CRIAÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPOSTOS A DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATOS. / Walter César Góes Valente. - Rio de Janeiro, 2021.

79f. f.; il.

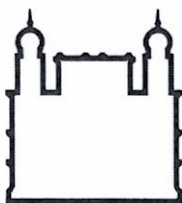
Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Malacologia de Vetores, 2021.

Orientadora: MARTA JULIA FARO DOS SANTOS COSTA.

Co-orientadora: GIULIANA VIEGAS SCHIRATO.

Bibliografia: f. 71-79

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. Criação de molusco. 3. Taxa de fecundidade. 4. Taxa de Fertilidade. 5. Taxa de desenvolvimento. I. Título.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MALACOLOGIA DE VETORES

WALTER CÉSAR GÓES VALENTE

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIONÔMICOS, FÍSICOS E QUÍMICOS NA CRIAÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) EXPOSTOS A DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTAÇÃO E SUBSTRATOS.

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Especialização Lato sensu em Malacologia de Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovado (a) em 29/07/2021.

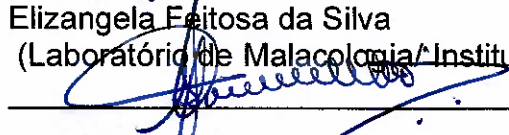
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Juberlan Silva Garcia

(Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios / Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ /RJ)

  
\_\_\_\_\_  
Elizângela Feitosa da Silva

(Laboratório de Malacologia/ Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RJ)

  
\_\_\_\_\_  
Maurício Carvalho de Vasconcellos

(Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental/ Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ /RJ)

Rio de Janeiro, 29 de Julho de 2021.

A minha família e meus amigos,  
que colaboraram para construção moral  
e ética do meu ser, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família por estar sempre presente na minha vida e sempre juntos de minhas decisões.

À minha orientadora Dra. Marta Julia Faro (Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios) que me orientou com toda paciência e enorme carinho e que tive uma enorme felicidade em contar para a produção deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Giuliana Schirato (Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos) que além de ser uma das pessoas mais doces que conheço, é uma amiga leal.

À minha noiva Karla Yasmin, que sempre me apoia firmemente no meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao meu grande amigo João Resende (Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos), que me direcionou e me ajudou na parte estatística e tem sido um grande amigo durante meus 6 anos de FIOCRUZ.

Ao Dr. Floriano Paes da Silva Jr., que incentivou o meu crescimento acadêmico possibilitando-me fazer esse curso.

À toda equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios que me recebeu de braços abertos para que eu pudesse desenvolver meu trabalho de pesquisa em seu laboratório.

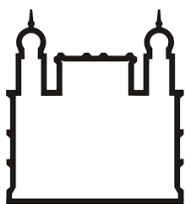
À equipe do Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos com quem pude contar, mesmo quando estava ausente fazendo essa pós-graduação.

Aos amigos que fiz durante o curso: Camila Araújo, Gamaliel Amorim, Paulo Rodrigues e Karina Leal.

Meus sinceros agradecimentos.

*O que vemos muda o que sabemos.  
O que sabemos muda o que vemos.*

*Jean Piaget*



INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MALACOLOGIA DE  
VETORES

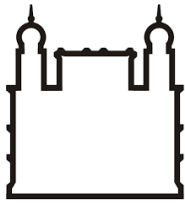
## RESUMO

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* que representa ainda hoje graves problemas para saúde pública. *Biomphalaria glabrata* é descrita como a que melhor se adapta ao hospedeiro intermediário para a transmissão de *S. mansoni*. Considerando o complexo ciclo biológico do parasita, são requeridos recursos consideráveis para se manter esse ciclo biológico em laboratório. Sendo assim, é importante racionalizar o processo tendo em vista a maior eficiência dessa metodologia. Neste trabalho, foi possível avaliar os parâmetros bionômicos, físicos e químicos de *B. glabrata* frente a diferentes tipos de alimentação e substratos. Também foram avaliados o efeito dos nutrientes (alface e ração de peixe) e os substratos (argila, mix de sais e  $\text{CaCO}_3$ ) e suas possíveis variações em 10 diferentes grupos. Desta forma, foram observados seus efeitos no crescimento, mortalidade, fecundidade e fertilidade do molusco. Ao longo do período de experimento, foi aferido o peso e tamanho dos animais (a cada 20 dias) durante o período de desenvolvimento que durou 126 dias, utilizando uma balança semi-analítica e uma régua Tridente. Os efeitos da fecundidade foram avaliados semanalmente através da contagem do número de massas ovíferas por moluscos, número de ovos por massa ovífera e número de ovos por molusco, assim como a fertilidade foi avaliada através da taxa de eclosão dos ovos por moluscos. Os animais dos grupos alimentados com ração de peixe: RCA (Ração de peixe, Carbonato de Cálcio e Argila), RSA (Ração de peixe, Sais e Argila) e RA (Ração de peixe e Argila) apresentaram maior desenvolvimento (em relação ao peso e tamanho) apresentando significância estatística em relação ao controle LCA (Alface, Carbonato de cálcio e Argila), e apresentaram a argila como substrato em comum. Em relação à fecundidade, os grupos RCA e RA



também apresentaram maior produção de ovos por molusco e massa ovígera por molusco. Foram observados que os mesmos grupos RCA, RSA e RA também apresentaram significância estatística para a relação de ovos férteis para massa ovígera. Nesse trabalho, podemos concluir que os caramujos alimentados com ração de peixe obtiveram um aumento significativo de peso e tamanho em relação aos alimentados por alface. E em relação à maturidade sexual ocorreu de maneira mais precoce. Os animais submetidos a maior densidade populacional apresentaram maior mortalidade. Diante dos dados obtidos, foi possível observar que a alimentação interfere na fecundidade, aumentando número de ovos, massa e número de ovos por massa ovígera. Os resultados apresentados contribuem para melhorar as técnicas de criação, a fim de possibilitar a utilização desses animais em estudos experimentais em laboratório.

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*, criação de molusco, taxa de fecundidade e fertilidade, taxa de desenvolvimento.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MALACOLOGIA DE  
VETORES

## ABSTRACT

Mollusks of the genus *Biomphalaria* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, which still represents serious public health problems today. The *Biomphalaria glabrata* is described as the one that best adapts to the intermediate host for the transmission of *S. mansoni*. Considering the complex biological cycle of the parasite, considerable resources are required to maintain this biological cycle in the laboratory. Therefore, it is important to rationalize the process in order to make this methodology more efficient. In this work, it was possible to evaluate the bionomic, physical and chemical parameters of *B. glabrata* against different types of food and substrates. The effect of nutrients (lettuce and fish food) and substrates (clay, mix of salts and  $\text{CaCO}_3$ ) and their possible variations in 10 different groups were also evaluated. In this way, its effects on growth, mortality and fertility of the mollusk were observed. Throughout the experiment period, the weight and size of the mollusks (every 20 days) were measured during the development period, which lasted 126 days, using a semi-analytical scale and a Trident ruler. The effects of fertility were evaluated weekly by counting the number of ovigerous masses per mollusk, number of eggs per ovigerous mass and number of eggs per mollusk, as well as fertility was evaluated through the hatching rate of eggs by mollusks. The mollusks in the groups fed with fish feed: RCA (Fish feed, Calcium Carbonate and Clay), RSA (Fish feed, Salts and Clay) and RA (Fish feed and Clay) showed greater development (in relation to weight and size) showing statistical significance in relation to the LCA control (Lettuce, calcium carbonate and clay), and presented clay as a common substrate. Regarding fertility, the groups RCA and RA also showed higher production of eggs per mollusk and ovigerous mass per mollusk. It was observed that the same groups RCA, RSA and RA also showed statistical significance for the ratio of fertile eggs to ovigerous mass. In this work, we can conclude that the snails fed

with fish feed obtained a significant increase in weight and size in relation to those fed by lettuce. And in relation to sexual maturity, it occurred earlier. The mollusks submitted to a higher population density showed higher mortality. In view of the data obtained, it was possible to observe that feeding interferes with fertility, increasing the number of eggs, mass and number of eggs per ovigerous mass. The results presented contribute to improve breeding techniques, in order to enable the use of these mollusks in experimental studies in the laboratory.

**Keywords:** *Biomphalaria glabrata*, mollusk breeding, fertility rate, development rate.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Caramujo *Biomphalaria glabrata*. Foto retirada do site da Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz ([www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)) ..... 18
- FIGURA:02:** *Biomphalaria*: animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).  
Fonte: Paraense (1975) ..... 20
- FIGURA 03:** Cronograma do planejamento experimental para alimentação e uso do substrato..... 26
- FIGURA 04:** Régua Tridente® modelo 4384..... 27
- Figura 05:** Balança semi-analítica Bel Mark M1203 .....27
- Figura 06:** Efeito da mortalidade dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, carbonato e Argila, LCA= Alface, carbonato e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila. O gráfico A podemos observar a mortalidade em porcentagem durante os dias 48, 70, 84, 104 e 126.....29
- FIGURA 07:** Efeito do desenvolvimento do microambiente dos grupos: (d) =dias, RC= Ração e carbonato de cálcio, RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, carbonato e Argila, LCA= Alface, carbonato e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila. O gráfico A podemos observar o desenvolvimento da média de peso durante os dias 48, 70, 84, 104 e 126. No gráfico B podemos observar o desenvolvimento da média de tamanho peso durante os dias 48, 70, 84, 104 e 126..... 32
- FIGURA 08:** Influência da alimentação e substrato no desenvolvimento na média de peso dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e Carbonato de cálcio RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, Carbonato de cálcio e Argila, LCA= Alface, Carbonato de cálcio e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila ao longo de 126. Gráfico A Gráfico

A=48 dias. Gráfico B=70dias. Gráfico C= 84 dias. Gráfico D= 104 dias Gráfico. E=126 dias..... 34

**FIGURA 09:** Influência da alimentação e substrato no desenvolvimento na média de Tamanho dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e Carbonato de cálcio RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, Carbonato de cálcio e Argila, LCA= Alface, Carbonato de cálcio e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila ao longo de 126. Gráfico A Gráfico A=48 dias. Gráfico B=70dias. Gráfico C= 84 dias. Gráfico D= 104 dias Gráfico. E=126 dias. .... 36

**FIGURA 10:** Relação média de massa ovígera por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias entre 62 e 119..... 45

**FIGURA 11:** Relação massa ovígera por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 19..... 46

**FIGURA 12:** Relação média de ovos por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119..... 48

**FIGURA 13:** Relação ovos por molusco dos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119..... 49

**FIGURA 14:** Relação média de ovos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119..... 51

**FIGURA 15:** Relação ovos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e carbonato de cálcio RA= Ração e argila, LA= Alface e argila, RS=Ração e sais, LS= Alface e sais, RCA=Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA= Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA=Ração, sais e argila, LSA= Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119..... 52

**FIGURA 16:** Relação média de ovos eclodidos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119..... 54

**FIGURA 17:** Relação ovos eclodidos por massa ovígera dos grupos. RC= Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119..... 55

**FIGURA 18:** Porcentagem de eclosão dos grupos experimentais. RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119..... 56

## Sumário

<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	22
3.1	Objetivos Específicos.....	22
<b>3.</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	23
2.1	Origem e criação de <i>B. glabrata</i> .....	23
2.2	Administração dos nutrientes (alface e ração de peixe) e exposição aos substratos (argila e CaCO <sub>3</sub> ) .....	23
2.3	Avaliação dos parâmetros de desenvolvimento e fecundidade .....	26
<b>4.</b>	<b>Resultados</b> .....	28
4.1	Efeito do microambiente sobre o desenvolvimento .....	28
4.2	Efeito da alimentação sobre o desenvolvimento .....	32
4.3	Efeito do substrato sobre o desenvolvimento .....	38
4.4	Fecundidade e fertilidade .....	43
4.4.1	<i>Fecundidade</i> .....	43
4.4.2	<i>Fertilidade</i> .....	51
<b>5.</b>	<b>Discussão</b> .....	57
5.1	Mortalidade .....	57
5.2	Desenvolvimento .....	59
5.3	Fertilidade e fecundidade .....	62
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b> .....	69
<b>7.</b>	<b>Referências</b> .....	71

## 1. Introdução

O filo Mollusca é o segundo maior grupo zoológico, e seus representantes estão em vários ambientes naturais e sendo fundamentais na manutenção dos ecossistemas onde eles façam parte (Barnes 2005) Dentre os representantes desse filo a Classe Gastropoda e a família Planorbidae estão incluídos os moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, foram descritas onze espécies e uma subespécie de moluscos límnicos do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910): *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), essa três primeiras são encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni*. E as outras são *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria. kuhniana* (Clessin, 1883), *Biomphalaria intermedia* (Paraense & Deslandes) 1962, *Biomphalaria amazonica* (PARAENSE & DESLANDES, 1966), *Biomphalaria oligoza* (PARAENSE, 1974), *Biomphalaria occidentalis* (PARAENSE 1981), *Biomphalaria cousini* (PARAENSE, 1966) e *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (PARAENSE, 1984). Entretanto a *B. amazonica*, *B. peregrina* e *B. cousini* são considerados hospedeiros potenciais com base em infecções experimentais (PARAENSE & Correa, 1971, CORREIA & PARAENSE, 1973 e TEODORO et al., 2010).

A *Biomphalaria* adapta-se as variações das condições do meio e servem de alimento para crustáceos, insetos, peixes, roedores e aves. Podem ser encontrados em ambientes lânticos ou lóticos especialmente em águas rasas como lagos, lagoas, poços, cisternas, valas, de irrigação e de drenagem e em locais onde a vegetação se encontra enraizada (PIERI 2008).

A presença e o aumento da população de *Biomphalaria* sp no ambiente aquático depende não só de suas características físicas e químicas, mas também do clima e da fauna existente. A composição do solo, a hidrografia, o clima e a geografia física de uma dada região têm efeitos significativos na dinâmica de populações destes moluscos (BARBOSA et al. 1994).



Devido a ampla distribuição, e a capacidade de colonizar ambientes diversos, e a características como hermafroditismo, e a rápida maturação sexual e a sua grande capacidade reprodutiva fazem com que esses moluscos alcancem o sucesso na colonização de diversos habitats (Brasil, 2014).

Quanto aos aspectos físico-químicos da água, *A. B. glabrata* apresenta altos limites de tolerância, adaptando-se a diferentes características dos sistemas dulcícolas. As concentrações de cloreto de sódio, cálcio e magnésio influenciam diretamente a permanência dos moluscos nestes ambientes. Atuam como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos (ABÍLIO et al. 2007), a dinâmica de populações destes moluscos sofre influência de fatores como composição do solo, a hidrografia, o clima e a geografia de uma dada região (BARBOSA et al. 1994).

Em exemplares adultos da *Biomphalaria Glabrata* sua concha pode medir entre 20mm a 40mm de diâmetro e de 5mm a 8mm de largura e cerca de 6 a 7 giros, com as paredes laterais dos giros arredondados (PARAENSE, 1975; BRASIL,2014.)



Figura 1: Caramujo *Biomphalaria glabrata*. Foto retirada do site da Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz ([www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br))

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários da *Schistosoma mansoni*, que representa ainda hoje graves problemas para saúde

pública. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015), estimativas recentes sugerem que cerca de 262 milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na África Subsaariana, no Oriente Médio, Caribe e América do Sul, resultando em até 200.000 mortes anualmente, enquanto mais de 42 milhões de indivíduos infectados apresentam alta morbidade. No Brasil, dados do Ministério da Saúde, destacam o Brasil com 6 milhões de indivíduos podem estar infectados e 25 milhões correndo ao risco de contrair a doença (BRASIL, 2014).

A *B. glabrata* é relatada como a espécie de melhor hospedeiro intermediário para a adaptação do *S. mansoni*. Isto se deve principalmente à sua ampla distribuição geográfica e suas altas taxas de eficiência de infecção e transmissão (CARVALHO et al., 2008).

A espécie *B. glabrata* habita ambientes límnicos que apresentam condições ecológicas necessárias para sua sobrevivência e reprodução e são capazes de se reproduzir através da autofecundação (hermafroditas), porém, apresentam preferência pela fecundação cruzada.

Geralmente, a oviposição ocorre durante a noite e a massa de ovos ou desova é colocada sobre o lado inferior de folhas flutuantes, plantas, rochas, conchas de outros moluscos, madeira etc. Os ovos ao serem depositados são envolvidos por uma cápsula constituída por uma substância gelatinosa, produzida pela glândula nidamental (SOUZA, 2020). O enrijecimento da massa ovígera ocorre de forma lenta a partir do contato com a água, e em torno de meia hora passa a apresentar a forma de um disco transparente, firme e flexível (PARAENSE, 1972). O ovo começa a se dividir cerca de duas horas após a postura e entre sete e dez dias pode ocorrer a eclosão (SOUZA, 2020).

Entretanto na literatura, vários trabalhos apontam para alguns fatores que podem interferir na manutenção da criação e no desenvolvimento das *Biomphalarias spp* no laboratório como: condição de autofecundação e fecundação cruzada, luz, temperatura, condições da água, pH, oxigênio da água, cálcio, substrato e alimentação (PIERI, 2008).

As características bionômicas, representam chaves para táticas de sobrevivência, como número de ovos ou filhotes, o tamanho da prole, a distribuição do esforço produtivo, entre outras, representam aspectos fundamentais para a sobrevivência da espécie, sendo, portanto, um importante “medidor” do comportamento da espécie em relação ao meio ambiente, como elas se relacionam e como estão organizadas (ODUM, 1988).

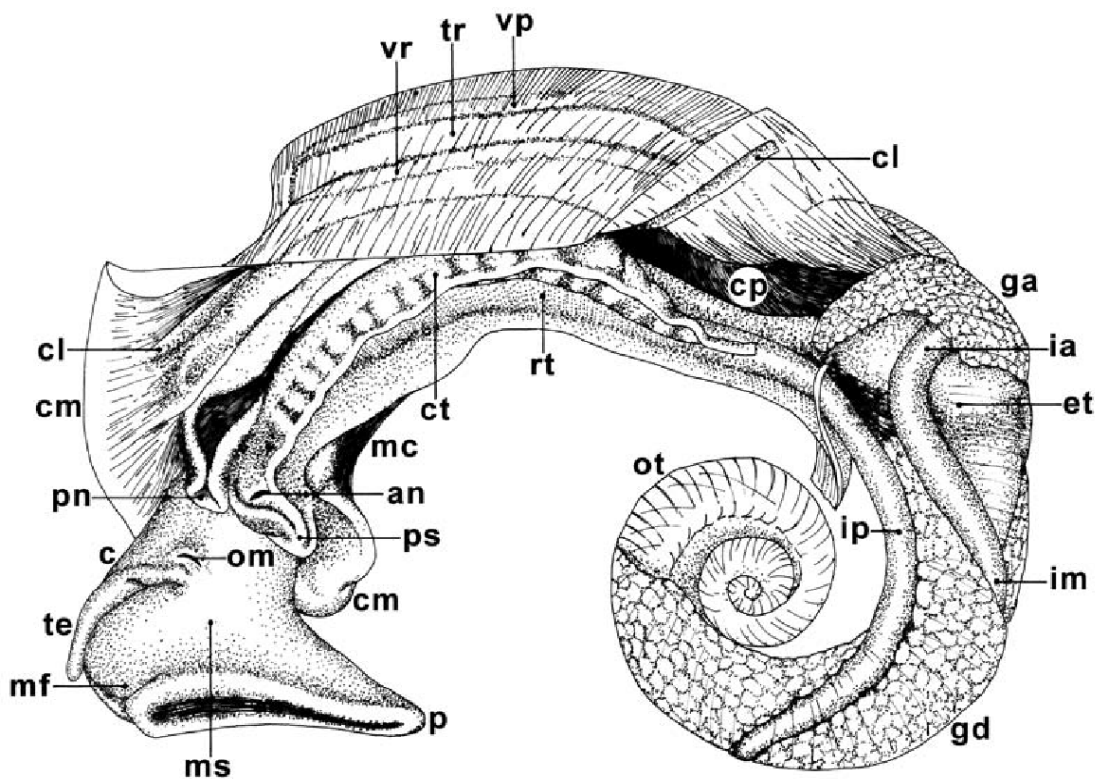


Figura:02: *Biomphalaria*: animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot). Fonte: Paraense (1975).

Fatores bionômicos de *B. glabrata* foram estudados por vários autores como a reprodução (COSTA et al. 2004). Um desses fatores como podemos observar são as diferenças na fecundidade de *B. glabrata* em animais não infectados, a média foi de: 2,8 de massa ovígera e 54,3 ovos por caramujo. Quando o espécime foi criado individualmente, em autofecundação a média foi

de 1,0 massa ovígera por caramujo e 8,1 ovos por caramujo. Quanto a fertilidade, foi obtida uma taxa de eclosão de 57,2% quando os animais estavam sendo observados individualmente (autofecundação) e de 64,6% quando estavam em grupo. Contudo, nota-se que com o passar das semanas, indivíduos criados separadamente (autofecundação), obtiveram uma queda significativa na produção de massa ovígera e do número de ovos. Os resultados mostraram uma diferença significativa no número de ovo por massa ovígera, em autofecundação quando comparados com a fecundação cruzada, mostrando a preferência da espécie pela fecundação cruzada como mostra a literatura.

Um outro fator que pode influenciar na fecundidade e na fertilidade é a alimentação. Segundo Chieff (1975), dietas ricas em proteínas são capazes de promover tanto aumento de crescimento quanto da fertilidade no animal adulto. Dessa forma, a utilização de farinha de carne e aveia aumenta o índice de crescimento e oviposição quando comparado às demais dietas. Entretanto, causam um elevado índice de mortalidade nos primeiros 15 dias, equivalendo a 50% dos animais testados. Em contrapartida, a dieta constituída por farinha de carne e alfafa também ocasionou elevada mortalidade nas fases iniciais, enquanto animais alimentados com apenas alface fresco e alfafa não foram observadas essa taxa de mortalidade. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido à mudança dos hábitos alimentares, já que eram alimentados somente com alface no início do experimento.

A influência do equilíbrio do pH iônico é essencial para vida de *B. glabrata*, segundo Silva (2014), à acidificação natural e antrópica de ambientes aquáticos resultam em danos para comunidades que vivem neste ambiente. Invertebrados aquáticos como insetos, crustáceos e moluscos tornam-se escassos ou extintos em ambientes com pH abaixo de 5,7.

Um elemento também importante para vida dos moluscos é o cálcio. Alguns autores têm descrito como um fator limitante na distribuição e adaptação dos moluscos no ambiente. Sua participação na contração muscular, desenvolvimento embrionário, crescimento, resistência ao ataque de predadores e nas respostas imunológicas é essencial, além de ser importante na formação

da concha, onde fica armazenado na forma de carbonato de cálcio (DAWIES; ERASMUS, 1984; MARTINS-SOUZA, 2006. TUNHOLI et al. 2011 MELLO-SILVA et al. 2006). A mobilização do cálcio da concha para hemolinfa em *B. glabrata* exposto a diferentes soluções de CaCO<sub>3</sub>, em diferentes intervalos de tempo, foi observado por Magalhães et al. (2011), os quais concluíram que ocorre mobilização frequente de cálcio nos sítios intramolusco de acordo com a quantidade de cálcio disponível no ambiente.

Considerando o complexo ciclo biológico do parasita são requeridos recursos tanto de origem financeira quanto de capacitação técnica dos funcionários, para se manter esse ciclo biológico em laboratório afim de manter a qualidade da criação para modelos experimentais (FARO et al., 2013). Sendo assim, é importante racionalizar o processo tendo em vista a maior eficiência dessa metodologia.

Portanto o estudo de parâmetros bionômicos associados a elementos químicos e físicos se justifica neste estudo já que participam no processo vital da vida dos moluscos.

## 2. Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros bionômicos, físicos e químicos de *Biomphalaria glabrata* frente a diferentes tipos de alimentação e substratos.

### 3.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito dos nutrientes (alface e ração de peixe) e dos substratos (argila, mix de sais e  $\text{CaCO}_3$ ) nos parâmetros bionômicos e na sobrevivência de *B. glabrata* criada em condições laboratoriais.

- 1) Identificar se os nutrientes e os substratos interferem nas mudanças dos parâmetros analisados, como: Na fecundidade e fertilidade do molusco;
- 2) Na sobrevivência e no crescimento;
- 3) No pH da água e na temperatura ambiente e dos aquários.

### 3. Materiais e métodos

#### 2.1 Origem e criação de *B. glabrata*

Neste experimento foram utilizadas desovas de moluscos do gênero *B. glabrata*, criados em condições de laboratório utilizando descendentes desses moluscos coletados no município de Sumidouro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (22° 02' S e 42° 41' 42" W) uma área rural da Mata Atlântica. Autorização do SISBIO No 38482/1 para coleta de moluscos

Exemplares de *B. glabrata* provenientes do laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios– Instituto Oswaldo Cruz, IOC- FIOCRUZ, Brasil, foram mantidos em laboratório, dentro de recipientes de polietileno (70 x 20 x 45 cm) contendo 4 litros água desclorada proveniente de reservatório próprio. Foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) frescas higienizadas com água corrente desclorada. Dois cubos de isopor (60 x 30 x 5 mm) foram colocados na água dos recipientes para substrato de ovipostura (AUGUSTO et al., 2009).

#### 2.2 Administração dos nutrientes (alface e ração de peixe) e exposição aos substratos (argila e CaCO<sub>3</sub>)

Para compor os 10 grupos, foram utilizadas as massas ovígeras de moluscos descendentes oriundos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios. Essas foram colocadas em 10 aquários para a eclosão da F1, cada aquário com 4 litros d'água desclorada, expondo em cada grupo em condições diferentes de alimentação e substrato.

Nesses aquários foram usados como substratos argila obtida da localidade Maromba, MG (8 gramas) e carbonato de cálcio da Vitrocel (CaCO<sub>3</sub>)(4 gramas) na proporção 2:1, e um mix de sais composto por: Cloreto de Cálcio (43,41g), Carbonato de Cálcio (83,3g), Cloreto de Ferro (0,037g), Carbonato de Magnésio (8,3g), Sulfato de Magnésio (49,91g), Cloreto de Potássio(1,6g), Sulfato de Potássio(3,33g), Bicarbonato de Sódio (32,83g) e Cloreto de

Sódio(8,3g) onde foi utilizado 1ml por L. A alimentação utilizada foi a base de alfaca (0,2g) e ração de peixe (0,05g) da marca Alcon® Basic que contém em sua composição: Farelo de soja, farinha de peixe, creme de milho, farinha de lula, adsorvente de micotoxinas, leveduras, óleo de soja refinado, espirulina desidratada, corantes naturais (cochonilha, urucum, cúrcuma) (1,54 %), proteína isolada de soja, premix vitamínico mineral (0,85 %), óleo de peixe, fécula de mandioca, cloreto de sódio, beterraba desidratada, farinha de minhoca, premix mineral (0,1 %), aditivo prebiótico (0,09 %), antioxidantes (Etoxiquin, Propilgalato, ácido cítrico, BHA, BHT), aditivo enzimático (0,05 %) e enriquecido a cada quilo do produto com: Vitamina A (30.000 UI), Vitamina D3 (5.000 UI), Vitamina E (83,3 UI), Vitamina K3 (8,3 mg), Vitamina C (250 mg), Vitamina B1 (6,7 mg), Vitamina B2 (25 mg), Vitamina B6 (6,7 mg), Vitamina B12 (33,3 mcg), Niacina (116,7 mg), Pantotenato de cálcio (50 mg), Biotina (0,33 mg), Ácido fólico (2,5 mg), Colina (520 mg), Ferro (83,3 mg), Cobre (8,3 mg), Zinco (83,3 mg), Manganês (66,7 mg), Selênio (0,25 mg), Iodo (1,67 mg), Metionina (833,3 mg). Inicialmente, sempre sendo observado se não iria se depositar ou acumular, para evitar o aparecimento de outros organismos, e levando em conta a necessidade de cada grupo de animais, e com o tempo foi utilizado de forma crescente até alcançar a base de alfaca de (0,2g) e ração de peixe (0,2g). Nos primeiros 48 dias com 0,05g de ração de peixe, após 70 dias, o quantitativo de ração de peixe foi ajustado para 0,1g, e no 84º dia foi reajustado para 0,2g e mantida até o final do crescimento. Sendo alimentados duas vezes por semana. Como condiz o mapa experimental Figura 03. O grupo LCA (alfaca, carbonato e argila), foi considerado controle, PARAENSE E CORRÊA (1973).



<b>Microambiente</b>	<b>Alimentação</b>	<b>Substrato</b>
1(RC)	Ração de Peixe 0,05g/0,1g/0,2g	CaCO <sub>3</sub> 4g
2(LC)	Alface 0,2g	CaCO <sub>3</sub> 4g
3(RA)	Ração de Peixe 0,05g/0,1g/0,2g	Argila 8g
4(LA)	Alface 0,2g	Argila 8g
5(RS)	Ração de Peixe 0,05g/0,1g/0,2g	Mix de sais 4ml
6(LS)	Alface 0,2g	Mix de sais 4ml
7(RCA)	Ração de Peixe 0,05g/0,1g/0,2g	CaCO <sub>3</sub> 4g + argila 8g
8(LCA- Controle)	Alface 0,2g	CaCO <sub>3</sub> 4g + argila 8g
9(RSA)	Ração de Peixe 0,05g/0,1g/0,2g	Mix de sais 4ml + argila 8g
10(LSA)	Alface 0,2g	Mix de sais 4ml + argila 8g

*Figura 03. Mapa experimental para alimentação e uso do substrato. Os animais foram alimentados nos primeiros 48 dias com 0,05g de ração de peixe e 0,2g alface por caixa. Após 70 dias, o quantitativo de ração de peixe foi ajustado para 0,1g. Já no 84º dia foi reajustado para 0,2g e mantida até o final do crescimento. Sendo alimentados duas vezes por semana.*

### 2.3 Avaliação dos parâmetros de desenvolvimento e fecundidade

Para avaliar os parâmetros de desenvolvimento do animal, foi utilizado uma régua Tridente® modelo 4384 (Figura 4) para desenho em círculo, com o objetivo de aferir e avaliar tamanho (cm).

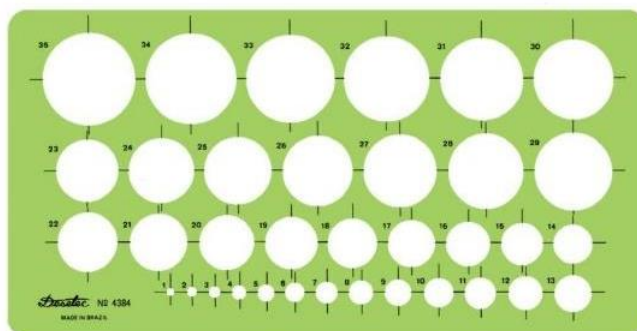


Figura 04: Régua Tridente® modelo 4384

E uma balança semi-analítica Bel Mark M1203 para estimar o ganho de peso(g). Também foram utilizadas pinças e colheres para a manipulação dos animais para evitar danos às estruturas destes durante a manipulação. Também foi utilizado papel absorvente para drenar o excesso de água para a pesagem dos animais. Os dados referentes ao tamanho, peso, quantidade e aspecto dos animais foram coletados por volta de 20 dias em 20 dias, a partir do dia 48, anotados no livro de registro.



Figura 05: Balança semi-analítica Bel Mark M1203

As observações da fecundidade (nº de massa ovígera por moluscos, nº de ovos por massa ovígera e nº de ovos por molusco), assim como a fertilidade (taxa de eclosão dos moluscos) foram realizadas semanalmente (a partir do início da oviposição), com auxílio de um microscópico estereoscópico e um contador. Uma vez por semana, foi avaliado esses parâmetros incluindo a taxa de sobrevivência, e levando em consideração aspectos visuais tais como tamanho e aspectos da água.

Para que não houvesse variações por interferências externas, foi realizado a aferição do pH da água de condicionamento dos moluscos, utilizando pHmetro digital de bancada PHS-3B Phtek, e temperatura, utilizando um termômetro digital laboratorial, onde era aferida a temperatura e pH semanalmente, a Luminosidade foi feita de forma artificial, por períodos de 10 horas de luz e 14 de escuro.

Os resultados deste estudo foram analisados pela ANOVA bifatorial, seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o Programa PRISM versão 8.0.1.

## 4. Resultados

### 4.1 Efeito do microambiente sobre o desenvolvimento

Os moluscos *B. glabrata* foram submetidos a diferentes microambientes com 03 substratos e 02 tipos de alimentações que influenciaram os parâmetros: desenvolvimento, peso do animal e tamanho da concha. As observações foram realizadas pontualmente nos dias 48, 70, 84, 104 e 126, conforme demonstrado na Figura 07.

Foi observada na Figura 06 a diminuição no número de animais (ocasionada por mortes) ao longo do período de 126 dias de avaliação. Nos primeiros 48 dias, observou-se que o grupo RC possuía N=30, após 70 dias passou para 29 animais e se manteve assim durante o período de 84, 104 e 126 dias, estabilizando a mortalidade no grupo, tendo sua mortalidade de 3,33% nesses 126 dias.

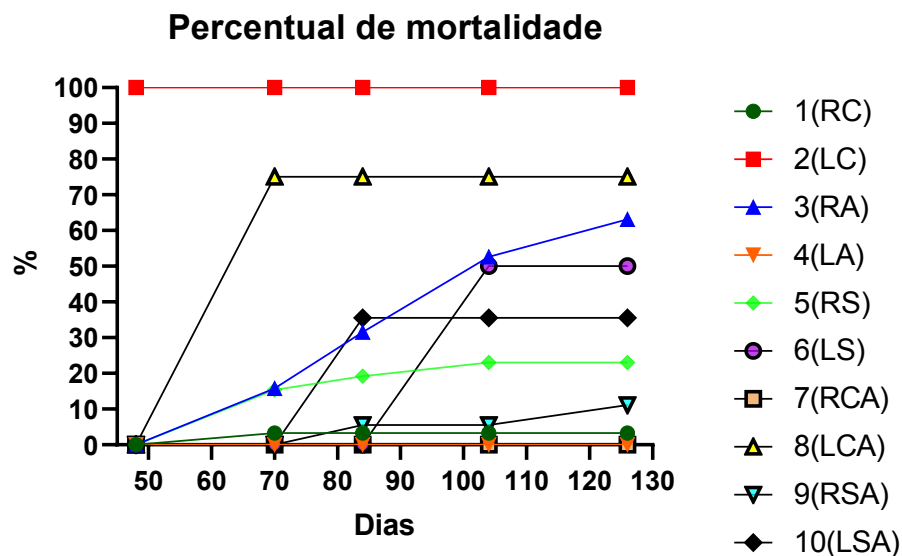


Figura 06: Efeito da mortalidade dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, carbonato e Argila, LCA= Alface, carbonato e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila. O gráfico A podemos observar a mortalidade em porcentagem durante os dias 48, 70, 84, 104 e 126

No grupo LC, apesar de ter ocorrido a eclosão dos ovos, no entanto ocorreu a morte de todos os indivíduos já nos primeiros 48 dias.

No grupo RA, podemos observar a diminuição gradual do número de indivíduos ao longo dos dias de observação. A quantidade de animais no período de 48 dias de observação foi de 19 caramujos; após 70 dias restaram 16 animais, aos 84 dias reduziu para 13, 104 dias em 09 caramujos e após 126 dias o (N) de encontrava em 07 indivíduos, tendo uma mortalidade de 63,16%.

O grupo LA, apresentou apenas 01 animal durante todo o período de experimento, não apresentando concha ao fundo da caixa ou sinal de morte dos espécimes daquele grupo indicando que não houve eclosão de suas massas ovíferas.

No Grupo RS, foi identificado o quantitativo de 26 animais no período de avaliação 48 dias, onde foram observadas conchas no fundo da caixa nessa primeira análise, indicando uma alta mortalidade. Após o período de 70 dias passou a apresentar N = 22. No 84º dia a quantidade diminuiu para 21 animais, no dia 104 reduziu o número de animais para 20, e no último dia de avaliação com (126 dias) manteve a quantidade de 20 animais, tendo uma mortalidade de 23,08%.

No grupo LS foi identificado pequeno número de animais nos primeiros 48 dias (N = 2), não apresentando conchas no fundo das caixas, indicando que não houve a eclosão dos ovos. Esse número se manteve constante após o período de 70 e 84 dias. Depois de 104 dias houve a mortalidade de 01 animal, onde se encontrou somente 01 indivíduo no grupo neste período, e esse único animal se manteve vivo após o período 126 dias tendo uma mortalidade de 50%.

No grupo RCA, foi observado um número muito pequeno de animais (04 indivíduos nos primeiros 48 dias). No entanto, foi observado um grande desenvolvimento, em relação ao tamanho, quando comparado aos demais grupos, nos primeiros 48 dias. Não ocorreu mortalidade no referido grupo após a observação do 48 ao 126 dia.

No grupo LCA (grupo controle), foi observado que o quantitativo inicial de 12 animais aos 48 dias. Após esse momento, houve uma grande mortalidade

que foi identificada aos 70 dias, onde o grupo passou a apresentar N=3, mantendo esse quantitativo constante nos próximos períodos de análise, tendo uma mortalidade de 75%.

O grupo RSA, no entanto, foi contabilizado 18 animais, nos primeiros 48 dias, mantendo tal quantidade de caramujos aos 70 dias. No 84º dia houve redução, ocasionada por mortes, para 15 animais. Já no 104º dia de observação, o quantitativo subiu para 17 animais. Esse acréscimo se deu por um possível erro de contagem ou alguma eclosão não contabilizada. No último dia de aferição foi identificada a redução para 16 espécimes no grupo, tendo uma mortalidade de 11,11%.

Por fim, no grupo LSA, aos primeiros 48 dias, foi observado um número muito grande de animais. Todavia em função de seu pequeno tamanho (inferior a 2,5mm), tornou-se impraticável a análise de peso e tamanho nesse período de observação. Tal situação prejudicou até mesmo a determinação do quantitativo de caramujos neste momento. A determinação da quantidade (contabilizado em 45 animais) foi efetuada posteriormente quanto os animais estavam maiores.

Aos 70 dias o grupo manteve o número de animais e continuou apresentando peso e tamanho muito reduzindo - o que impossibilitou realizar as análises de tamanho/peso. Para fins analíticos continuou a ser utilizado o valor de 3mg no peso do animal e 2mm de tamanho. Já aos 84 dias foi identificado o quantitativo N = 29 e com peso e tamanho reduzido. Foi mantido para fins analíticos o peso de 3mg e o tamanho de 2mm.

O quantitativo de animais não mudou após 104 dias aferição (N = 29), todavia o peso se manteve 3 mm para fins estatísticos pois os animais ainda apresentavam o número abaixo dessa faixa. No entanto, o tamanho já pode ser contabilizado, pois já se encontravam superior a 3mm.

Após 126 dias, a quantidade de animais se manteve estável e foi possível aferir os valores normalmente. Isso devido ao desenvolvimento alcançar uma

faixa igual ou superior de peso de 3mg e tamanho de 3mm. Todavia o grupo teve uma mortalidade de 35,56%.

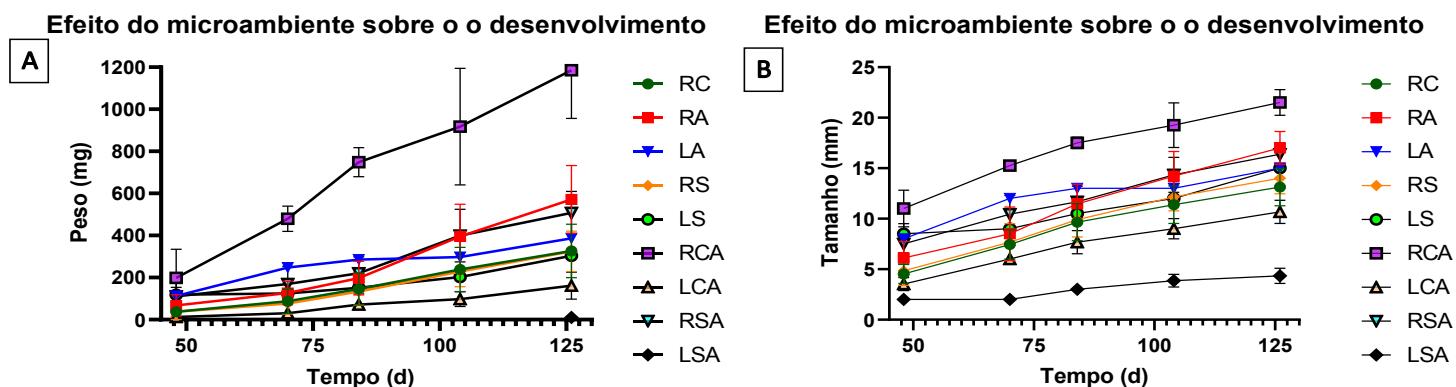


FIGURA 07: Efeito do desenvolvimento do microambiente dos grupos: (d) =dias, RC= Ração e carbonato de cálcio, RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, carbonato e Argila, LCA= Alface, carbonato e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila. O gráfico A podemos observar o desenvolvimento da média de peso durante os dias 48, 70, 104 e 126. No gráfico B podemos observar o desenvolvimento da média de tamanho peso durante os dias 48, 70, 84, 104 e 126

Os gráficos presentes na Figura 07 demonstraram um significativo desenvolvimento do peso e do tamanho dos animais nos grupos cuja alimentação era a base de Ração de Peixe, como nos grupos: RS (ração e sais), RC (ração e carbonato de cálcio), RA (ração e argila), RSA (ração, sais e argila), RCA (ração, carbonato e argila).

O grupo LCA (alface, carbonato e argila), onde foi fornecida alface como base de alimentação, foi considerado controle, uma vez que esta é considerada a condição padrão (devido a utilização dessa a alimentação e substrato) em diversos moluscários para fins de experimentação no Brasil e no exterior.

Os animais foram alimentados nos primeiros 48 dias com 0,05g de ração de peixe e 0,2g alface por caixa. Após 70 dias, o quantitativo de ração de peixe foi ajustado para 0,1g. Já no 84º dia foi reajustado para 0,2g e mantida até o final do crescimento. A quantidade de alface foi mantida durante todo o experimento. Após 105 dias foi observado a necessidade de troca da água das caixas dos grupos que continha ração de peixe como alimentação, pois encontrava-se turva. Não foi possível concluir se tal situação foi ocasionada por excesso de

alimentação ou crescimento flora microbiana que se desenvolveu pela presença desse tipo de alimento, o que não ocorreu com os animais alimentados apenas com alface.

Aos 13 dias através da análise visual, houve eclosão dos ovos de todas as caixas, contudo o grupo LCA apresentou baixa eclosão. Após 24 dias, foi realizada a análise visual dos grupos experimentais e foi observado que os grupos RC, RA, RS e RSA apresentaram melhores resultados, tanto em relação à taxa de eclosão quanto ao tamanho, mesmo não sendo possível aferir seu peso e tamanho nesse período devido aos pequenos valores apresentados. Os grupos RA e RSA apresentaram indivíduos de maior tamanho, enquanto o grupo RS apresentou maior quantitativo de animais de tamanho mais reduzido, e o grupo RC apresentou também maior quantidade por caixa em relação aos grupos com alimentação de alface em geral.

#### 4.2 Efeito da alimentação sobre o desenvolvimento

Durante o decorrer do desenvolvimento foi possível observar a diferenciação significativa dos grupos onde houve a alimentação por alface e Ração de Peixe, os moluscos dos diferentes grupos reagiram de maneiras diferentes a exposições a diferentes alimentações.

O grupo LCA (alface, carbonato e argila), onde foi fornecida folhas frescas de alface como base de alimentação, foi considerado controle, PARAENSE E CORRÊA (1973)

Todos os espécimes de moluscos do grupo LC morreram, tornando-o assim a necessidade de novas análises nesse grupo.

Os grupos LA e LS apresentaram quantitativo bastante reduzido de caramujos já nas primeiras análises, possuindo 01 indivíduo em LA e 02 no segundo grupo (LS). Conseqüentemente, por esse motivo, tais grupos foram excluídos das análises estatísticas.



É possível observar na Figura 8A, que aos 48 dias de observação, o grupo RC apresenta a média de peso de 37,1mg, enquanto o RSA 110,5 mg e quando comparado ao controle LCA – que apresentou média de 12,6mg. Tais resultados demonstram que os dois grupos alimentados com ração de peixe (RC e RSA) apresentaram diferença significativa em relação ao ganho de peso dos caramujos (ao 48º dia de avaliação) em relação ao grupo controle alimentado com alface. Nessa primeira análise foi possível observar que os grupos RCA e LCA (controle) não apresentam diferenças estatísticas significativas, mesmo aparentemente sendo maior, com média de 198,3mg, por provável diferença entre o peso entre os indivíduos do grupo.

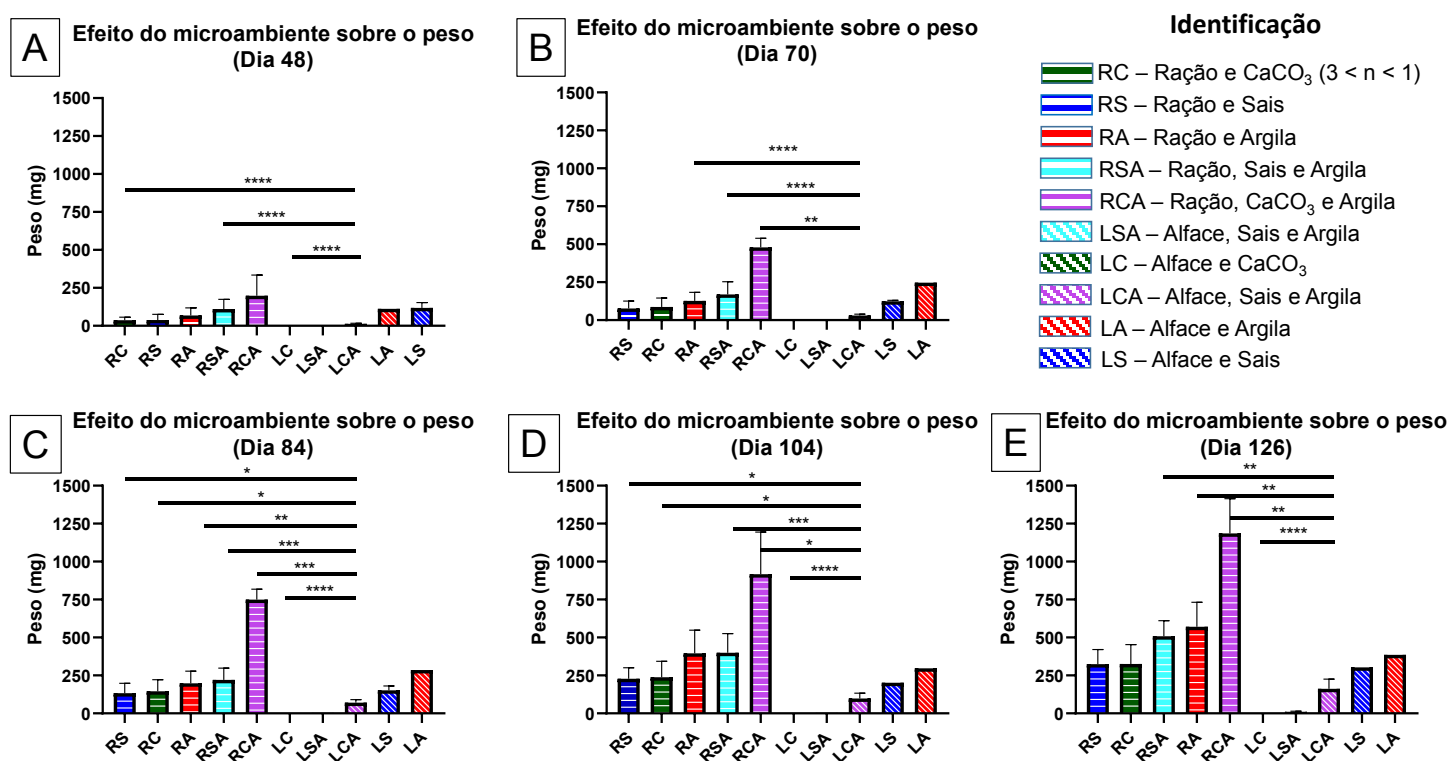


Figura 08: Influência da alimentação e substrato no desenvolvimento na média de Tamanho dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e Carbonato de cálcio RA= Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, Carbonato de cálcio e Argila, LCA= Alface, Carbonato de cálcio e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila ao longo de 126. Gráfico A Gráfico A=48 dias. Gráfico B=70dias. Gráfico C= 84 dias. Gráfico D= 104 dias Gráfico. E=126 dias.

Também foi observado na Figura 8A que os indivíduos que compõem o grupo RSA possuem peso médio de 110 mg, tal dado possui significância estatística quando comparado a peso médio dos animais do grupo LSA (alface,

sais e argila), onde substrato é o mesmo (mix de sais + argila) e a variável é a alimentação - mostrando que animais do grupo RSA alimentados com a ração de peixe tiveram uma diferença entre de peso considerável em relação ao grupo LSA. É importante lembrar que os espécimes do grupo LSA tiveram a o peso muito reduzido, impossibilitando as aferições na balança semi-analítica. Diante disso, foi considerado nesse momento o valor de referência como 3 mg para os animais desse grupo, pois abaixo desse ponto, a balança semi-analítica poderia perder a sua precisão.

Além do mais, outras questões foram levadas em consideração: uma situação de manipulação excessiva dos caramujos (já que estes possuíam um tamanho muito pequeno) poderia lesionar os mesmos; a presença de acúmulo de água nos animais no momento da pesagem, poderia causar interferências durante a análise, já que uma gota de água poderia variar o peso, alterando os valores (o que geraria um erro experimental e conseqüente alteração os dados).

Na Figura 09A, nos primeiros 48 dias, os grupos RA e RSA, apresentavam a média dos tamanhos de 6,1mm; 7,5 mm. Tais dados tiveram significância estatística em relação ao grupo controle LCA com média de tamanho de 3,5mm ( $P < 0,0001$ ). Desta vez, o grupo RCA apresenta significância estatística relevante em relação ao controle LCA (média de tamanho 11mm), mostrando uma diferença considerável de 214,2% no desenvolvimento dos moluscos alimentados por ração de peixe em relação ao controle ( $P = 0,0092$ ).

Em comparação com as médias de tamanhos do grupo RSA com o seu grupo submetido às mesmas condições de microambiente, alterando apenas alimentação, LSA podemos observar significância estatística ( $P < 0,0001$ ), o grupo alimentado com ração de peixe obteve um ganho médio de tamanho de 7,5mm em relação ao controle que obteve como média de tamanho 2mm.

Na Figura 08B, é possível observar que, após 70 dias, os grupos RA e RSA apresentaram significância estatística quando comparados entre si ( $P < 0,0001$ ), com pesos médios de 126 mg e 169 mg respectivamente. A comparação dos dados do grupo RCA também demonstrou ser estatisticamente significativa ( $P = 0,0016$ ) em relação ao controle LCA, onde grupo que foi

alimentado com a ração obteve uma média de peso de 479mg em relação ao controle que obteve, aproximadamente, 30mg.

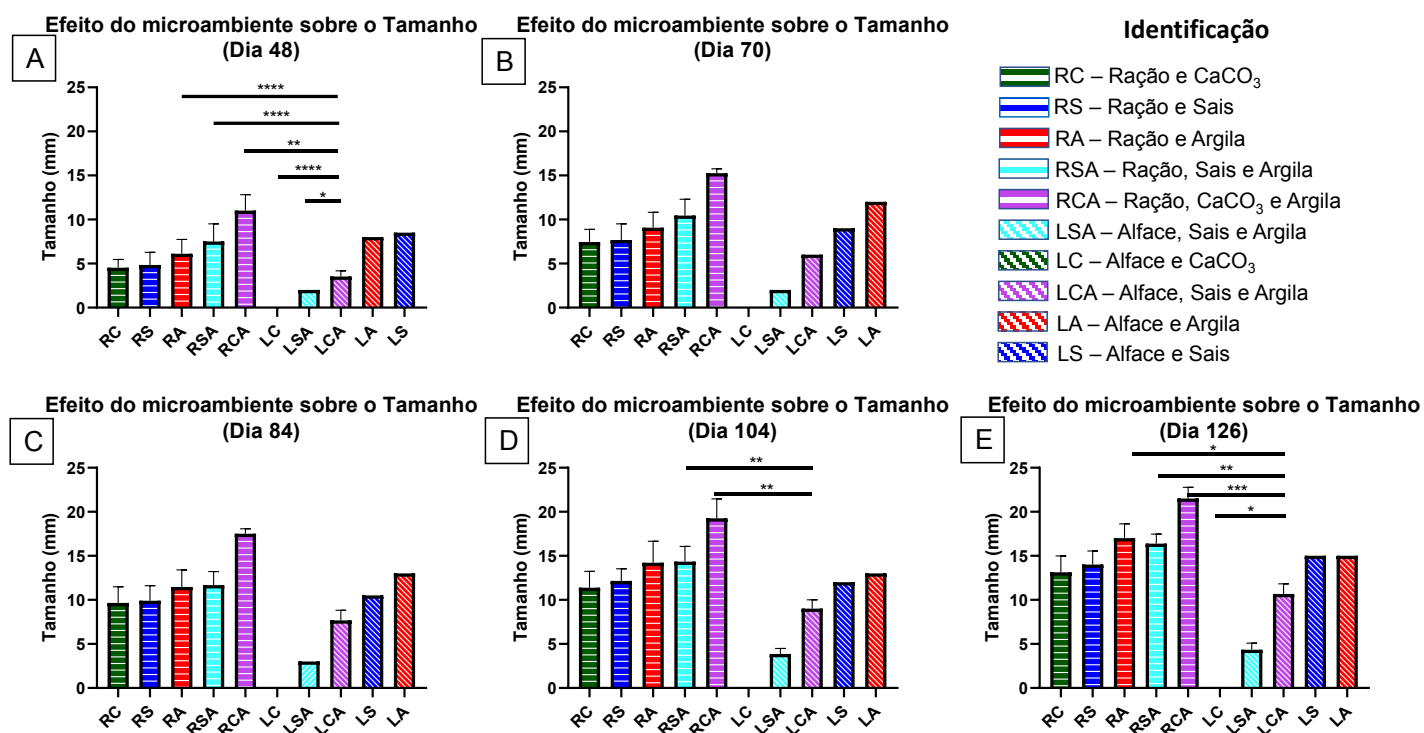


Figura 09: Influência da alimentação e substrato no desenvolvimento na média de Tamanho dos grupos: RC= Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e Carbonato de cálcio RA=Ração e Argila, LA= alface e Argila, RS=Ração e Sais, LS= Alface e Sais, RCA=Ração, Carbonato de cálcio e Argila, LCA= Alface, Carbonato de cálcio e Argila, RSA=Ração, Sais e Argila, LSA= Alface, Sais e Argila ao longo de 126. Gráfico A=48 dias. Gráfico B=70dias. Gráfico C= 84 dias. Gráfico D= 104 dias Gráfico. E=126 dias.

Os espécimes do grupo LSA, demonstrados na Figura 08B, continuaram com o peso muito reduzido e não ultrapassaram o peso de 3mg aos 70 dias de observação. Enquanto o grupo RSA obteve peso médio de 169mg e apresentou significância estatística em relação ao LSA. Demonstrando que os animais dos dois grupos em que o substrato se manteve o mesmo, sendo que única variável é a alimentação, esses animais alimentados por Ração de peixe apresentaram desenvolvimento considerável em relação à média de peso como já vinha sendo observado na Figura 08A. Já em relação ao desenvolvimento do tamanho dos

mesmos grupos, foi possível observar também que estes continuaram apresentando significância estatística no 70º dia ( $P < 0,0001$ ).

Aos 84 dias de observação (Figura 08C), foi possível visualizar que todos os grupos que foram submetidos à alimentação por ração de peixe, quando avaliado o tamanho médio dos caramujos no experimento, apresentaram significância estatística em relação ao grupo controle LCA. Tanto o grupo RS, com a média de peso de 133,5mg ( $P = 0,0434$ ); como RC, peso médio 145,3 mg ( $P = 0,0134$ ); RA com média de 197,8 mg ( $P = 0,0019$ ); RSA que obteve média de 220,0 mg ( $P = 0,0001$ ) e RCA com 748,7mg de média ( $P = 0,0006$ ) sendo este último se destacando dos demais grupos, pois em relação do controle LCA que apresentou 71,0 mg de média. Estes dois últimos grupos (RCA e LCA) são submetidos aos mesmos substratos, somente variando a alimentação – apresentando diferença expressiva de peso, em relação ao controle positivo.

Comparando os dados dos grupos RSA e LSA, é observado que eles apresentam significância estatística entre si ( $P < 0,0001$ ) e média de pesos apresentadas é de 220,0 mg e 3 mg, respectivamente (peso esse que ainda não podia ser aferido pois se manteve como anteriormente). Tais dados confirmam o que já vem sendo observado nas análises anteriores, onde foi verificado maior desenvolvimento nos grupos onde a alimentação é a base de ração de peixe. É observado na Figura 09C (média de tamanho dos animais) que não há significância estatística em relação ao controle, mesmo sendo visualmente possível a comparação como podemos observar na figura 09C.

Aos 104 dias de experimento evidenciou-se, conforme visualizado na Figura 08D, que houve significância estatística entre os dados dos pesos médios dos grupos: RS, RC, RSA, RCA e LC (com  $P=0,0206$ ,  $P=0,0103$ ,  $P < 0,0001$ ,  $P=0,0350$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente) em relação ao controle LCA. Os grupos alimentados por ração de peixe continuaram mantendo o desenvolvimento mais acelerado em relação ao grupo controle LCA que foi alimentado por alface. Foi possível observar também que no grupo RS, a média de peso de 228,2 mg, enquanto o grupo RC apresentou 238,4 mg. Já o grupo RSA obteve peso médio de 399,8 mg e o RCA 917,0 mg. Vale salientar que o grupo RCA e o controle

LCA são “grupos espelhos”, ou seja, submetidos ao mesmo microambiente (carbonato de cálcio e argila), alterando apenas alimentação à qual foram submetidos. Após a avaliação dos resultados dos pesos, foi constatada considerável diferença no desenvolvimento entre os animais dos dois grupos.

Analisando a diferença dos pesos médios dos grupos RSA e LSA, é possível concluir que esta é estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ), apresentando peso médio de 399,8mg (RSA) em relação a 3mg de LSA (que permanece com o peso abaixo do valor indicado aos 104 dias de observação).

Na Figura 09D é possível observar que, aos 104 dias de experimento, a diferença entre as médias de tamanhos dos grupos RSA e RCA apresentam diferença significativa sob o ponto de vista estatístico em relação ao grupo controle LCA. A média de tamanho observada foi de 14,3mm e 19,2mm nos grupos RSA e RCA, respectivamente. Já o grupo LCA apresentou tamanho médio de 9mm – sendo constatada uma diferença considerável de 58,8 e 113,3% respectivamente na média de tamanho entre os grupos RSA e RCA, que foram submetidos a alimentação diferente em relação ao controle.

O grupo LSA, em comparação ao seu grupo espelho RSA, que é o grupo que manteve as mesmas condições de substrato variando somente a alimentação, também apresentou significância estatística ( $P < 0,0001$ ) em relação às médias de tamanho. Observou-se que o grupo RSA obteve 14,3mm e o grupo LAS que apresentou 3,8mm de tamanho médio (Figura 09D).

No último dia de experimento (126º dia), conforme observado na Figura 08E, a diferença entre as médias de pesos obtidas nos grupos RSA, RA, RCA e LC foram significativas estatisticamente quando comparadas ao grupo controle LCA. É possível observar, nessa última aferição, os seguintes valores: 507,8mg ( $P = 0,077$ ) para o grupo RSA; 571,1mg ( $P = 0,0039$ ) para RA e 1185,2mg para RCA ( $P = 0,0090$ ). Em relação ao controle LCA, a média de peso obtida foi de 161,3mg. Todos os valores dos grupos citados anteriormente, onde os animais se alimentaram exclusivamente com ração de peixe, demonstraram significativo aumento de desenvolvimento de 214,8% no grupo RSA, 254,3% no grupo RA e

respectivamente em relação ao grupo controle alimentado com alface. Vale ressaltar, o grupo RCA apresentou uma média 634,6% de média de peso a mais em relação ao controle LCA.

Correlacionando os dados dos pesos médios dos grupos RSA e LSA, observou-se significância estatística, onde o grupo RSA apresentou média de peso de 507,8mg ( $P < 0,0001$ ) enquanto o seu grupo espelho LSA apresentou 10mg – saindo pela primeira vez da faixa de peso inferior aos 3mg, onde estava estacionado nas últimas análises. Tal diferença corresponde a 5 vezes a média de peso em relação a alimentação por alface.

Em relação ao desenvolvimento dos caramujos, conforme observado na Figura 09E, é verificado que o resultado das aferições das médias dos tamanhos entre os grupos RSA, RA, RCA e LC apresentaram resultados estatisticamente significativos quanto comparados ao controle LCA. Esses grupos tiveram média de tamanho de 16,3mm, 17mm, 21,5mm e 0mm (Não houve crescimento), respectivamente. Já o grupo controle LCA que obteve a média de 4,3mm, e o p-valor dos grupos RSA, RA e RCA foram:  $P = 0,0220$ ,  $P = 0,0034$  e  $P = 0,0006$  respectivamente. Demonstrando que os animais que se alimentaram com ração tiveram o desenvolvimento considerável e significativo de 279%, 295% e 400% respectivamente, em relação à alface.

Correlacionando os dados RSA com o seu grupo espelho LSA, foi observada significância estatística ( $P < 0,0001$ ). O grupo apresentou uma média de tamanho de 16,3mm nos animais alimentados com alface em relação a 4,3mm nos animais alimentados com a alface.

#### 4.3 Efeito do substrato sobre o desenvolvimento

Durante o decorrer do desenvolvimento do experimento, foi observada grande mortalidade em alguns grupos. No grupo LC ocorreu a morte de todos os espécimes, onde foram visualizadas muitas conchas ao fundo das caixas.

Ocorreu também baixo desenvolvimento dos indivíduos de alguns grupos como, por exemplo, LS e LA, onde foi visto a baixa eclosão dos ovos, onde LS apresentou apenas 2 indivíduos e LA apresentou 1 indivíduo. Tal situação tornou impossível a comparação com os demais grupos do experimento. Visualmente, podemos observar nas Figuras 08 e 09 que os grupos que receberam alface como alimentação apresentaram várias perdas dificultando a comparação entre indivíduos dentro do grupo. Pois como o observado, só podemos comparar a relevância do substrato entre os grupos LSA e LCA, onde LSA apresenta baixo desenvolvimento em relação ao tamanho e peso, em relação ao grupo LCA o qual foi utilizado como controle, pois utiliza o mesmo substrato e alimentação comumente utilizados pelos Laboratórios de Pesquisa em Malacologia.

No entanto os grupos alimentados com ração de peixe obtiveram o maior desenvolvimento de todos os animais sendo possível essa comparação. Podemos observar um desenvolvimento nas Figuras 06 e 07 nos gráficos dos grupos alimentados por ração, esse desenvolvimento é representado pelos cinco primeiros grupos: o RC, RS, RA, RSA e RCA. Grupos os quais demos prioridade nessa análise.

Na Figura 08A é possível observar que após 48 dias, o grupo RC com média de peso de 37,1mg apresentou relevância estatística em relação ao grupo RCA e RSA – que apresentaram medias de 138,3 mg ( $P=0,0488$ ), e 110,5 mg ( $P=0,0005$ ), respectivamente. Enquanto o grupo RS apresentou relevância estatística com os mesmos grupos RCA e RSA, apresentando o  $P=0,0130$  e  $P<0,0001$ , respectivamente. Quanto ao grupo RA, com média de peso de 67,7 mg, não apresentou significância diante de nenhum grupo com a alimentação em comum. No entanto, podemos observar que os grupos RSA e RCA exibiram desenvolvimento mais notável em relação aos outros grupos. A Figura 09A, onde é demonstrado a média de tamanho, podemos observar que o grupo RC com 4,5mm também apresenta relevância estatística diante dos grupos RCA com 11,0 mm ( $P=0,0006$ ) e RSA 7,5 mm ( $P<0,0001$ ), respectivamente. Quanto ao grupo RS, obteve com média de tamanho de 4,8 mm, e também apresentou significância estatística, em relação ao grupo RCA e RSA que tiveram  $P=0,0013$  e  $P=0,0003$  respectivamente. Em relação ao grupo RA com média de tamanho

de 6,1 mm não apresentou significância estatística sobre nenhum dos grupos a seguir RC, RS, RA, RSA e RCA.

No 70º dia como podemos observar na Figura 08B que o grupo RC, agora com peso médio de 87,0 mg, apresentou ser estatisticamente significativo em relação ao grupo RSA, que teve média de peso de 169,0 mg ( $P=0,0091$ ) e RCA com sua média de peso de 469,0 ( $P=0,0016$ ). Já o grupo RS, com peso médio 76,3mg, apresentou ser relevante sob o ponto de vista estatístico em relação ao grupo RSA ( $P=0,0032$ ) e RCA ( $P=0,0007$ ). Já o grupo RA, com peso médio de 126,7 mg, não apresentou relevância estatística. Na figura 09B, é possível visualizar que o grupo RC (com tamanho médio de 7,4 mm) obteve relevância estatística em relação aos grupos RCA que apresentou média de tamanho de 15,2 mm ( $P=0,0004$ ) e RSA, tamanho médio de 10,4mm ( $P<0,0001$ ). Em relação ao grupo RS, este apresentou tamanho médio de 7,6 mm e estatisticamente significativo quando comparados aos grupos RCA e RSA ( $P=0,0012$  e  $P=0,0010$ , respectivamente). Já o grupo RA, com média de tamanho de 9,0 mm não apresentou significância estatística em relação aos demais grupos.

Na Figura 08C, é demonstrado que após 84 dias de desenvolvimento, o grupo RC apresentou peso médio de 145,3 mg e ser estatisticamente relevante em relação ao grupo RCA, com peso médio de 748,7mg ( $P=0,0027$ ). O grupo RS, com peso médio de 133,5mg, apresentou ser estatisticamente significativo em relação ao grupo RSA, que obteve o seu desenvolvimento com a média de peso de 220,0 mg ( $P=0,0290$ ) e ao grupo RCA ( $P=0,0012$ ). Os dados grupo RA, com peso médio de 197,8 mg, não foram estatisticamente significativos quando comparados aos demais grupos do experimento ao 84º dia de avaliação. Em relação ao tamanho, como podemos observar na figura 09C, que o grupo RC com tamanho médio de 9,6 mm neste momento, apresenta significância estatística em relação aos grupos RCA ( $P=0,0009$ ) e RSA ( $P=0,0211$ ) que neste momento apresentam tamanho de 17,5mm e 11,6 mm, respectivamente. Já o grupo RS, com tamanho médio de 9,9 mm, apresentou significância estatística em relação ao grupo RCA ( $P=0,0021$ ). O grupo RA, com média de tamanho de 11,5 mm, continuou não apresentando significância diante aos demais grupos.



Após 104 dias, podemos observar na Figura 08D que o grupo RC obteve uma média de peso de 238,4 mg, apresentando relevância estatística em relação ao grupo RSA, que nesse momento de avaliação, apresentou média de peso de 399,8 mg ( $P=0,0039$ ), e ao grupo RCA que obteve peso médio de 917,0 mg ( $P=0,0017$ ). O grupo RS desenvolveu peso médio de 228,2 mg, apresentando relevância estatística em relação ao grupo RA ( $P=0,0352$ ), RSA ( $P=0,0025$ ) e RCA ( $P=0,0010$ ), o grupo RS média de peso de 395,4 mg. O grupo RA, apresentou relevância estatística quando comparado ao grupo RS ( $P=0,0352$ ). Quanto ao tamanho médio dos caramujos podemos observar na Figura 05D que o grupo RC com 11,3mm apresentou significância estatística em relação ao grupo RCA cujo tamanho médio foi 19,25 mm ( $P=0,0004$ ); ao grupo RSA que apresentou média de tamanho de 14,3 mm ( $P=0,0002$ ) e RA que apresentou média de tamanho de 14,22mm ( $P=0,0120$ ). Já o grupo RS com média de tamanho de 12,1 mm, apresentou significância estatística em relação ao grupo RCA ( $P=0,0040$ ) e RSA ( $P=0,0145$ ).

Ao 126º dia pode-se observar na Figura 08E, que o grupo RC com média de peso de 326,0 mg apresentou relevância estatística em relação ao grupo RCA com média de peso de 1185,2 mg ( $P=0,0008$ ), RSA com média de peso de 507,8 mg ( $P=0,0018$ ) e RA com média de peso de 571,1mg ( $P=0,0110$ ). Enquanto o grupo RS com média de peso de 324,3mg apresentou ser estatisticamente significativo quando comparado aos grupos RA com ( $P=0,0126$ ), RCA ( $P=0,0009$ ) e RSA ( $P=0,0031$ ). Quanto ao tamanho, podemos observar que na Figura 09E que o grupo RC, com média de tamanho de 13,1mm, apresentou significância estatística em relação ao grupo RCA ( $P=0,0001$ ) com tamanho médio de 21,5 mm; ao grupo RSA ( $P<0,0001$ ) com 16,3 mm e RA ( $P=0,0008$ ) que apresentava média de tamanho de 17,0mm. Quanto ao grupo RS com média de tamanho de 14,0 mm apresentou significância estatística em relação ao grupo RCA ( $P=0,0029$ ), ao grupo RSA ( $P=0,0072$ ) e ao RA ( $P=0,0256$ ).

Podemos observar que os grupos que mais apresentaram significância estatística em relação seu desenvolvimento foram os grupos RCA, RSA e RA. Em comum, estes grupos continham argila em seu substrato.

O grupo RCA apresentou maior desenvolvimento entre os grupos estudados, no entanto, vale salientar que o quantitativo de animais/grupo era de 4 indivíduos. Tal situação pode ter diminuído a competição por alimento, tornando-o mais abundante. Já a quantidade de caramujos no grupo de RSA foi de 16 indivíduos e no grupo RA era 7 indivíduos no último dia de aferição, isso explica a ultrapassagem do grupo RA sobre o grupo RSA ao longo do desenvolvimento – no qual aos 48 dias RA apresentava 19 indivíduos enquanto RSA apresentava 18. Com essa diminuição repentina no número de indivíduos do grupo RA, a comida veio se tornar mais abundante, podendo vir a interferir no desenvolvimento.

## 4.4 Fecundidade e fertilidade

### 4.4.1 Fecundidade

Foi observado diferenças significativas na fecundidade dos caramujos em determinados grupos expostos a diferentes microambientes. A análise foi realizada utilizando a média dos valores obtidos de cada grupo entre o período do 62º ao 119º dia, conforme demonstrado nas Figuras 10, 12 e 14.

As Figuras 11, 13 e 15 foram utilizadas para melhor ilustrar o desenvolvimento da fecundidade ao longo dos dias: 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119. Para melhor demonstração de como os diferentes microambientes interferem na prematuridade do alcance da maturação sexual, alterando assim o tempo da oviposição.

Como pode-se observar na Figura 10 os grupos RA e RCA e RSA demonstraram ovipostura considerável, com a média de 5,0, 4,1 e 0,9 massas ovígera por molusco. Enquanto grupo controle, como LCA não houve postura de massa ovígera no período de 119 dias. Como demonstrado no gráfico, pode-se perceber que os grupos LC não apresentou desenvolvimento devido ao óbito de todos os moluscos da caixa. Já o grupo LSA os animais estavam muito imaturos devido ao seu baixo desenvolvimento no tamanho e peso, como consta no desenvolvimento, demonstrado no tópico anterior.

É possível observar a relação média de massa ovígera por molusco ao longo de 119 dias, como demonstrado na Figura 10 - essa relação é maior nos grupos RA RCA e RSA.

O grupo RA apresentou uma média de 5,09 massas ovígeras por molusco, e apresenta significância estatística em relação aos grupos LA, apresentou  $P=0,0029$ , pois esse grupo apresentou uma média de 1 massa ovígera por caramujo ao longo desses 119 dias. Já em relação a LS, que apresentou média de massa por molusco de 0,27 ( $P=0,0045$ ). Com relação ao grupo LCA,

demonstrou  $P < 0,0001$ , devido ao não amadurecimento sexual desse grupo e não oviposição nesse período de 119 dias com a média de 0 massa por moluscos e o LSA, apresentou  $P < 0,0001$ , pois não houve também esse amadurecimento sexual pelo mesmo motivo do grupo anterior.

O grupo RCA também apresentou significância estatística em relação ao grupo LA, apresentando  $P = 0,0040$ . Ao grupo LS, que apresentou  $P = 0,0061$ . Com relação ao grupo LCA,  $P < 0,0001$ , devido ao não amadurecimento sexual desse grupo e a não oviposição nesse período de 119 dias e o grupo LSA, também mostrou  $P < 0,0001$ , devido a não haver também esse amadurecimento sexual desse grupo durante o período de experimento.

O Grupo RSA também veio apresentar significância estatística em relação aos grupos LCA com  $P = 0,0225$  e com o grupo LSA com  $P = 0,0225$ . Como observamos esse grupo não houve significância estatística com os grupos LS e LA que foram alimentados com alface.

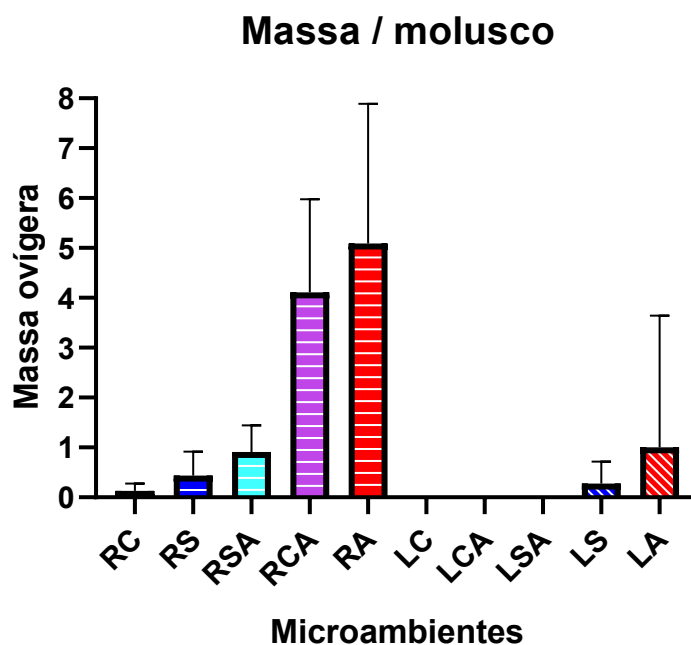


Figura 10: Relação média de massa ovígera por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias entre 62 e 119.

Foi possível observar que, em geral, os grupos experimentais, principalmente os grupos como RA e RCA apresentaram significância estatística em relação aos grupos cuja alimentação foi feita com alface, demonstrando um prematuro amadurecimento sexual.

É possível observar na Figura 11 os grupos alimentados por ração de peixe com os grupos: RC, RA, RCA, RSA apresentaram oviposição de massa ovígera a partir do dia 62, com exceção do grupo RS, que ovipôs a partir do dia 69. Enquanto os grupos alimentados por alface como o grupo LA, só foram ovipôr a partir do dia 69 e o LS a partir do dia 76. Os demais grupos como LCA e LSA não realizaram postura durante todos os 119 dias devido ao provável não amadurecimento sexual durante esse período. Já no grupo LC não houve postura de ovos, devido à morte de todos os indivíduos.

Foi possível constatar que entre os grupos estudados, RA e RCA apresentaram maior postura. Estes dois grupos tinham além da alimentação, possuíam a argila como substrato em comum.

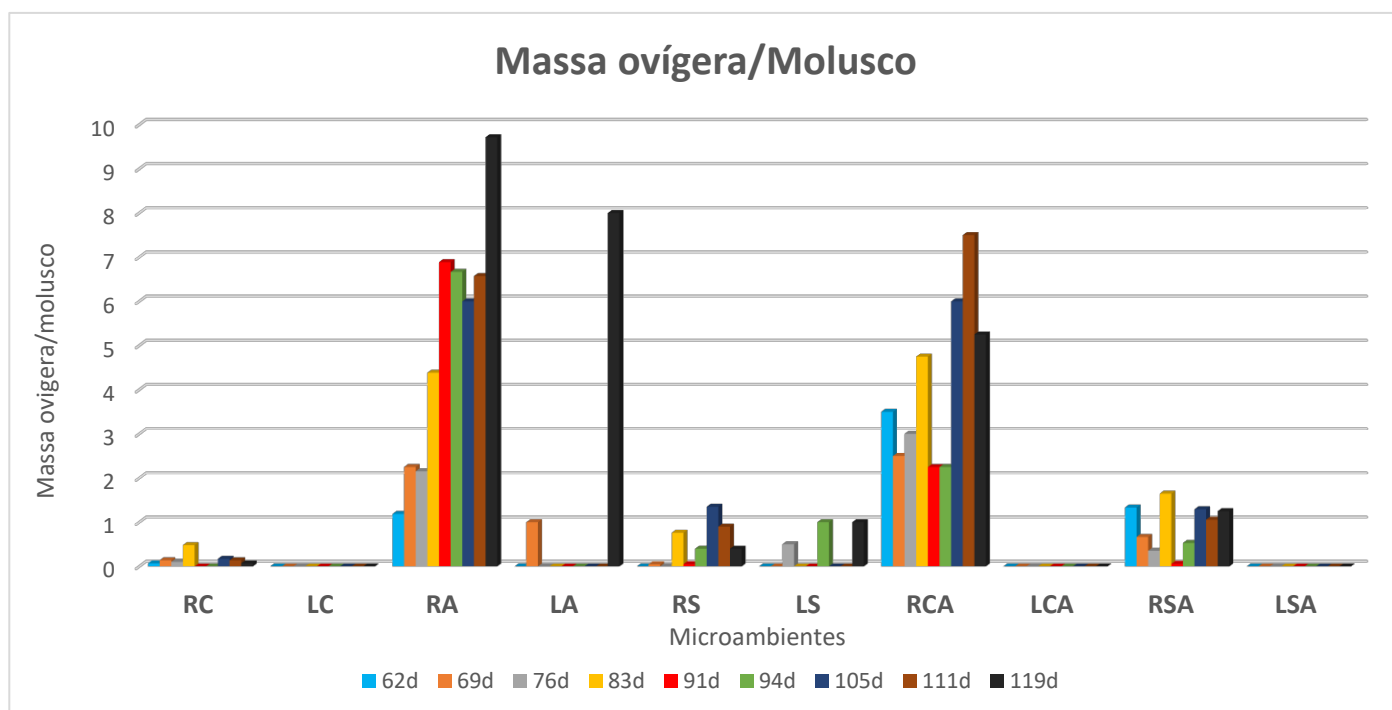


Figura 11: Relação massa ovígera por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119.

Quando observamos a relação média de ovos por moluscos, podemos constatar que houve uma relação semelhante com a relação média das massas ovíferas por molusco conforme demonstrado nas Figuras 10 e 12.

Conforme observado na Figura 12, o grupo RA apresentou significância estatística em relação ao grupo LA ( $P=0,0038$ ) apresentando a média de postura de 100,75 ovos por molusco em relação a LA, apresentando média de 9,96 ovos por molusco no mesmo período de avaliação. Também houve relevância estatística em relação ao grupo LS ( $P=0,0058$ ), onde a média de ovos por molusco foi 2,55. Também apresentou relação estatística significativa entre os grupos LCA e LSA ( $P<0,0001$ ). Todavia, em ambos os grupos, isso ocorreu devido a imaturidade sexual desses grupos durante esse período de 119 que veio a produzir uma média de 0 ovo por molusco durante todo o período do experimento.

O grupo RCA apresentou a média de ovos de 97,02 ovos por caramujo e esse dado foi estatisticamente significativo em relação ao LA ( $P=0,0018$ ). Os dados do grupo LS foram estatisticamente significativos ( $P=0,0027$ ) em relação aos resultados obtidos nos grupos LCA e LSA que tiveram o  $P<0,0001$  devido ao não amadurecimento sexual durante o período de experimento (Figura 12).

Outro grupo que apresentou significância estatística foi o grupo RSA, com a média de ovos por molusco de 17,90, sendo significante em relação ao grupo LC ( $P=0,0090$ ), devido a mortalidade de todos os indivíduos, e também com o grupo LSA ( $P=0,0090$ ) e com o grupo LCA ( $P=0,0090$ ), devido a não oviposição desses dois últimos durante todo período do experimento.

Mais uma vez constatamos os grupos RA, RCA e RSA realizaram maior oviposição, apresentando maior destaque os grupos RA e RCA. Esses grupos foram alimentados com ração de peixe, se destacando aos demais grupos.

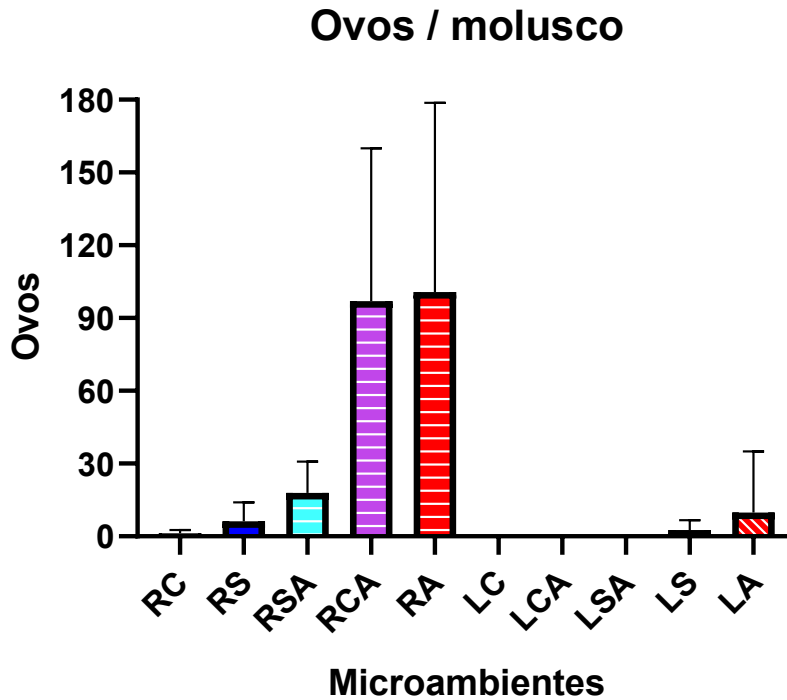


Figura 12: Relação média de ovos por molusco dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119.

Observamos também que nos grupos LSA e LCA não foi observada essa relação de ovos por molusco devido à não maturação sexual desses grupos durante esse período de 119 dias. O grupo LA foi observado um aumento da oviposição no dia 119, indicando atraso da maturação sexual (quando comparados aos grupos alimentados com ração), como pode-se observar na Figura 13.

Os Grupos RA, RCA e RSA apresentaram oviposição durante todos os dias de observação durante o experimento (entre os dias 69 e 119) indicando uma prematura maturação sexual pela observação da oviposição nesses grupos.

É possível observar que nos grupos RA, RCA e RSA houve maior desenvolvimento, além de ter a mesma alimentação e substrato (argila) em comum. O grupo LA, quem também possui argila como substrato, no último dia de observação (dia 119) apresentou uma grande quantidade de ovos, totalizando

76 ovos. No entanto o grupo LCA e LSA não tiveram postura mesmo com a argila como substrato.

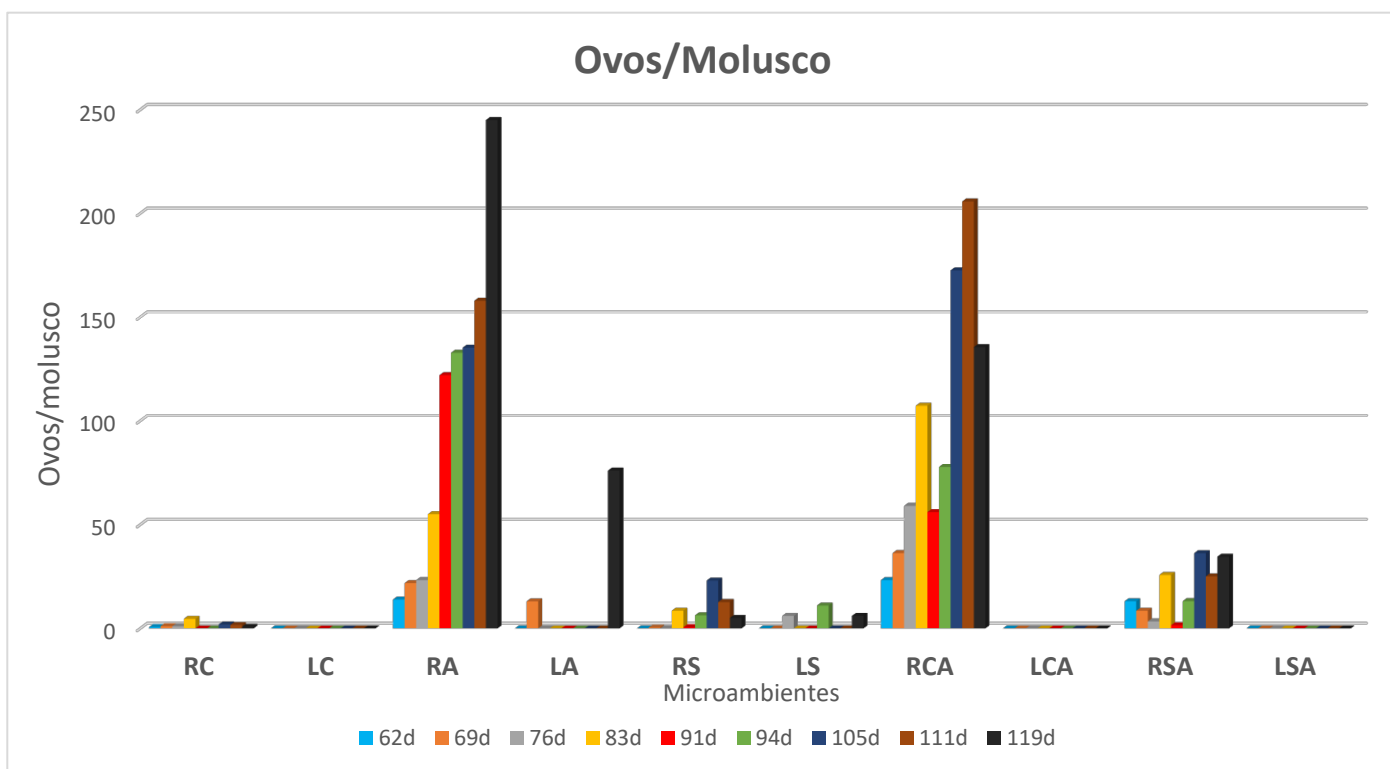


Figura 13: Relação ovos por molusco dos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alfaca e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alfaca e argila, RS = Ração e sais, LS = Alfaca e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alfaca, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alfaca, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119.

Na Figura 14, pode-se observar a relação de ovos por massa ovígera. Os grupos que apresentavam maior quantidade de ovos no interior de cada massa, ao longo desses 119 dias, foram os grupos RCA e RSA, seguido pelo RA, esses apresentaram significância estatística em relação a grupos como veremos posteriormente.

No grupo RCA, houve oviposição média de 22,75 ovos por massa ovígera, foi possível observar significância estatística quando comparados ao grupo LS, onde houve a produção média de 3,22 ovos por massa ovígera, apresentando um valor  $P=0,0060$ . Ocorreu também significância estatística em relação ao grupo LA onde sua oviposição apresentou a média de 2,55 ovos por massa ovígera ( $P=0,0022$ ), também foi observado significância estatística nos grupos



LCA e LSA, que apresentou  $P < 0,0001$ , devido a não oviposição desses grupos, que não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de desenvolvimento (sendo assim sua média foi de 0 ovo por massa ovígera). Como observado, o grupo RCA teve significativo desenvolvimento quando comparado aos grupos alimentados com alface.

Foi observado também que o grupo RSA, obteve grande número de ovos por massa ovígera, vindo a produzir uma média de 19,75 ovos por massa ovígera, obtendo significância estatística em relação ao grupo LA, onde sua oviposição apresentou média de 2,55 ovos por massa ovígera, apresentando valor  $P = 0,0093$ . O grupo LS, também apresentou significância estatística com o valor  $P = 0,0238$  onde houve a produção média de 3,22 ovos por massa ovígera. Os grupos LCA e LSA, apresentaram  $P = 0,0004$ , esses não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de desenvolvimento, ficando com a média de 0 ovo por molusco.

O grupo RA, com a média de 17,12 ovos por massa ovígera, também apresentou significância estatística ( $P < 0,0001$ ) em relação ao grupo LC – grupo esse com indivíduos mortos e que não houve oviposição ficando com a média de 0 ovo por massas ovígera. Os dados do grupo RA também foram estatisticamente significativos quando comparados aos de LA, onde sua oviposição apresentou a média de 2,55 ovos por massa ovígera apresentou valor  $P = 0,0344$ . O mesmo ocorreu com os grupos LCA e LSA, com os valores  $P = 0,0021$  e  $P = 0,0021$ , respectivamente. É importante salientar que os grupos LCA e LSA ainda não haviam alcançado a maturidade sexual. É importante destacar que o grupo RA apresentou a maior média de massa ovígera por molusco, e também de média de ovos por molusco, no entanto na relação média de ovos por massa ele veio a ficar atrás dos grupos RCA e RSA, mostrando massas ovígeras menores, com quantidade de ovos menores.

Conforme observado, esses grupos apresentaram quantidade maior de massa ovígera, com mais ovos em relação a massa. Foi constatado que os grupos alimentados com ração de peixe apresentaram maior quantidade de ovos por massa em relação aos grupos alimentados com alface.

## Ovos Férteis/ Massa Ovígera

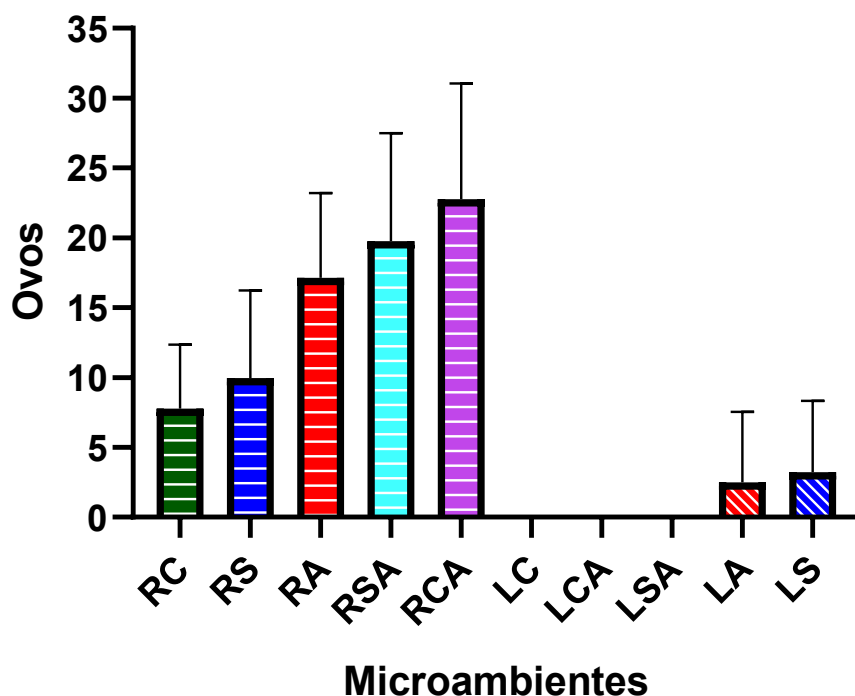


Figura 14: Relação média de ovos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e sais, LS = Alface e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alface, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119.

Conforme visualizado na Figura 15, a relação de ovos por massa ovígera já se mostrava maior no dia 62 em todos os animais alimentados com ração de peixe, o que só foi aparecer mais tardiamente (aos 69 dias) nos grupos LA e aos 76 dias no grupo LS, animais esses alimentados com a alface.

Os grupos LSA e LCA que foram alimentados com alface completaram os 119 dias sem ovipor, aparentemente demonstrando um tardio desenvolvimento no amadurecimento sexual dos indivíduos dos referidos grupos. No dia 119 os grupos RCA, RSA e RA apresentaram uma relação superior a 25 ovos por massa, enquanto o grupo alimentado por a alface (LA e LS) apresentaram menos de 10 ovos por massa nesse período. Os grupos LCA e LSA não alcançaram a maturidade sexual no período 119 dias de avaliação. Já o grupo RC não apresentou significância estatística em relação aos outros grupos e LC que apresentou todos os indivíduos mortos desde o primeiro dia, como pode-se observar na Figura 15.

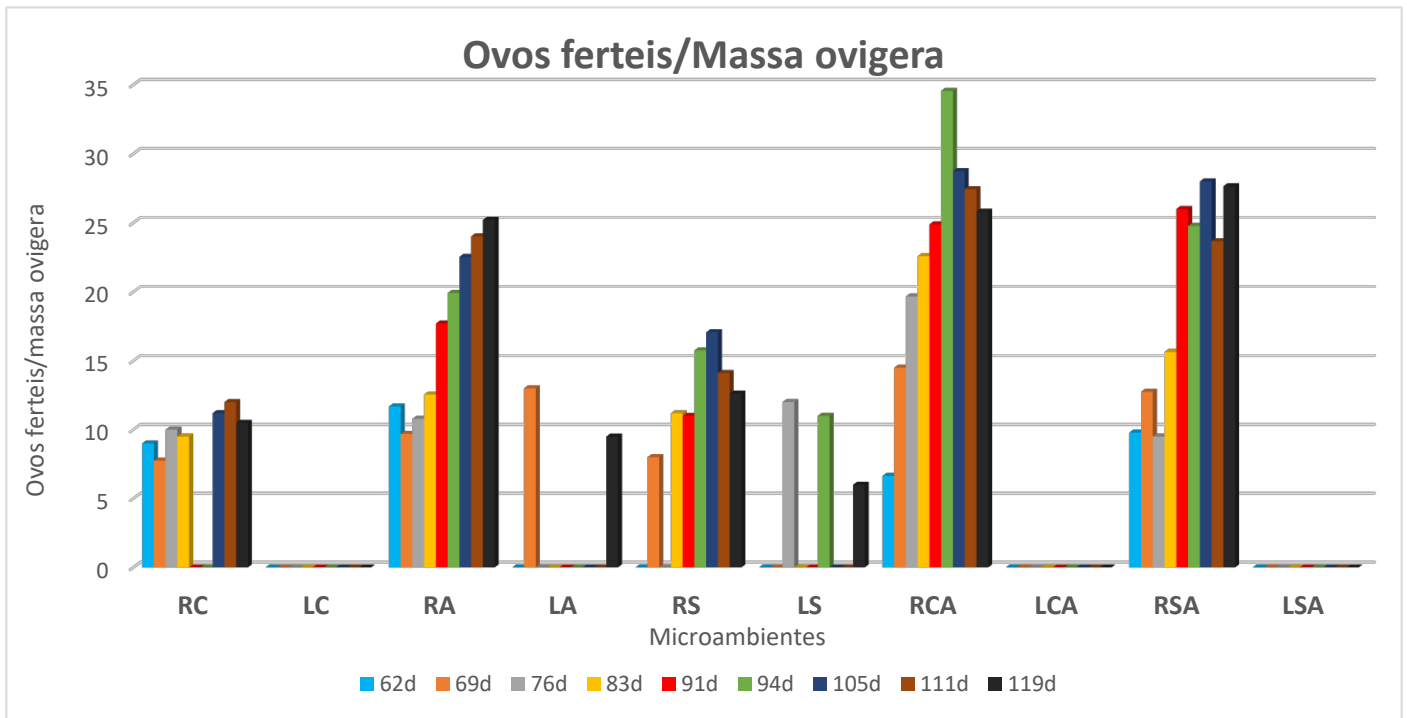


Figura 15: Relação ovos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC=Alface e carbonato de cálcio RA= Ração e argila, LA= Alface e argila, RS=Ração e sais, LS= Alface e sais, RCA=Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA= Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA=Ração, sais e argila, LSA= Alface, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119.

#### 4.4.2 Fertilidade

Em relação ao número de ovos eclodidos por massa ovígera, podemos observar que os dados apresentados na Figura 16 possuem um padrão de desenvolvimento semelhante ao da Figura 14 – mesmo que o número dos ovos eclodidos seja menor que os ovos férteis por massa ovígera, os gráficos apresentam semelhanças.

Os grupos que apresentaram a maior quantidade de ovos dentro de cada massa ovígera, ao longo dos 119 dias de experimento, foram o grupo RCA e RSA, seguido pelo RA como podemos observar na Figura 16.

No grupo RCA onde houve média de 16,75 ovos férteis por massa ovígera, podemos observar significância estatística ( $P < 0,0001$ ) em relação ao grupo LC, lembrando que todos os indivíduos desse grupo morreram e,

consequentemente, não ocorreu a oviposição, com média de 0 ovo eclodido por massa ovígera. O grupo LS apresentou média de ovos férteis por massa ovígera de 3,22 e apresentou significância estatística com o valor de  $P=0,0192$ , e LA também apresentou significância estatística com a média de 1,19 ovos eclodidos por massa ovígera e veio apresentar o valor  $P=0,0015$ ; Também houve significância estatística com os grupos LCA e LSA, que apresentou  $P<0,0001$ , devido à não ocorrência de oviposição desses grupos que não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de desenvolvimento, apresentando média de 0 ovo eclodido por massa ovígera. Como o observado o grupo RCA, houve significativo desenvolvimento em relação aos grupos LS e LA, grupos esses alimentados com alface.

Foi observado também que o grupo RSA, obteve notável número de ovos eclodidos por massa ovígera, uma média de 15,61 ovos eclodidos por massa ovígera. Foi possível observar significância estatística em relação ao grupo LC ( $P=0,0003$ ), devido à condição dos indivíduos mortos, não ter ocorrido assim a oviposição, ficando com a média de 0 ovo eclodido por massa ovígera. Também houve significância estatística em relação ao grupo LA que apresentou a média de 1,19 ovos eclodidos por massa ovígera ( $P=0,0028$ ). O grupo LS, apresentou a média de ovos férteis por massa ovígera de 3,22 e também apresentou significância estatística com o valor  $P=0,0333$ . O grupo LCA e LSA, que apresentou  $P=0,0003$ , esses dois grupos não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de desenvolvimento, ficando com as médias de 0 ovo eclodido por molusco.

O grupo RA também apresentou significância estatística em relação ao grupo LC, LCA e LSA, todos com o valor de  $P=0,0080$ . É importante lembrar que o grupo LC não apresentou desenvolvimento devido à morte de todos os indivíduos do grupo, e os animais dos grupos LCA e LSA ainda não haviam alcançado a maturidade sexual. Com isso não há significância estatística em relação aos dados dos grupos alimentados com a alface.

## Ovos eclodidos/Massa ovígera

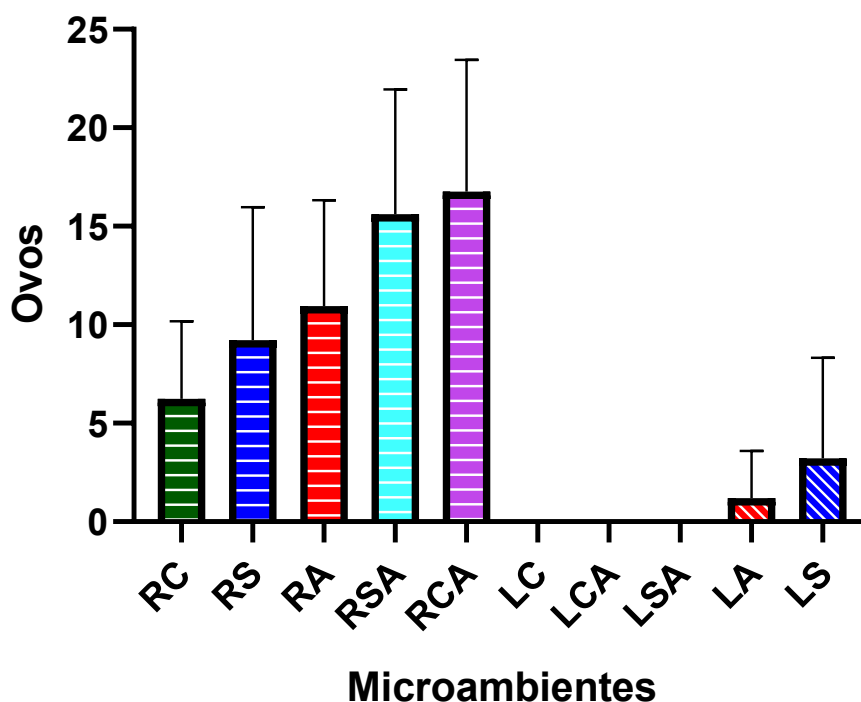


Figura 16: Relação média de ovos eclodidos por massa ovígera dos grupos RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alface e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alface e argila, RS = Ração e saís, LS = Alface e saís, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alface, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, saís e argila, LSA = Alface, saís e argila entre os dias 62 ao dia 119.

Na Figura 17, ao longo dos dias de experimento, é possível observar que os dados dos ovos eclodidos por massa ovígera são muito semelhantes aos dados de ovos férteis por massa ovígera na Figura 15, no entanto podemos salientar algumas diferenças, como de maneira geral o número da relação de eclodidos por massa é normalmente menor ao número de ovos férteis por massa, mostrando que mesmo os ovos estando fértil, nem todos acabam eclodindo.

No entanto, observa-se que no dia 83, o grupo RA obteve uma redução no número de ovos eclodidos por massa ovígera, em relação ao mesmo grupo e dia na Figura 15, mostrando que nesse dia houve baixa eclosão em relação ao número de ovos férteis, mesmo com uma boa quantidade de ovos férteis a quantidade de eclosão desses ovos se apresentou muito baixa, ao comparar os dados desses dois grupos (Figura 15 e 17). No dia 83, o número de ovos

eclodidos por massa foi de 0,52, enquanto o número de ovos férteis por massa foi de 12,54 uma diferença na fecundidade 24 vezes menor.

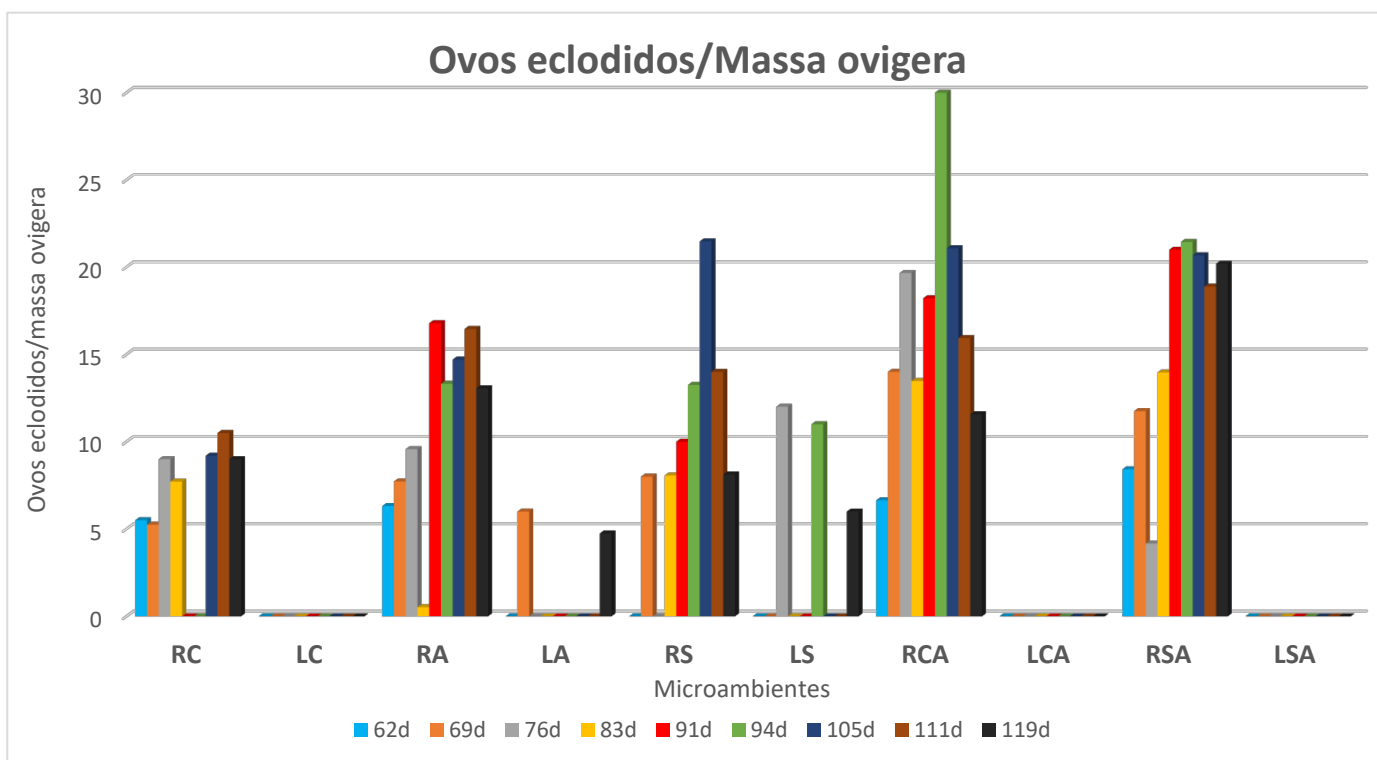


Figura 17: Relação ovos eclodidos por massa ovigera dos grupos. RC= Ração e carbonato de cálcio, LC = Alfaca e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alfaca e argila, RS = Ração e sais, LS = Alfaca e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alfaca, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alfaca, sais e argila nos dias 62, 69, 76, 83, 91, 94, 105, 111 e 119.

A relação a porcentagem de eclosão foi feita a partir do número de ovos férteis pelo número de ovos eclodidos, e como podemos observar a Figura 18, todos os animais alimentados com ração de peixe obtiveram média de eclosão superior a 60%. O grupo RS ficou com a média de 87,23%, enquanto RC, apresentou média de 79,34%, o grupo RSA apresentou média de 78,36%, o grupo RCA apresentou média de 77,01% e por fim o grupo RA que apresentou média de 63,76%. Enquanto os grupos alimentados por alfaca como o grupo LS ficou com média de 100% e LA apresentou média de 48,07%. Vale lembrar que durante todo o período de 119 dias os grupos LCA e LSA não apresentaram oviposição, não sendo possível aferir sua taxa de eclosão. Em relação ao grupo LC não houve eclosão devido a morte de todos os indivíduos logo no início do experimento.

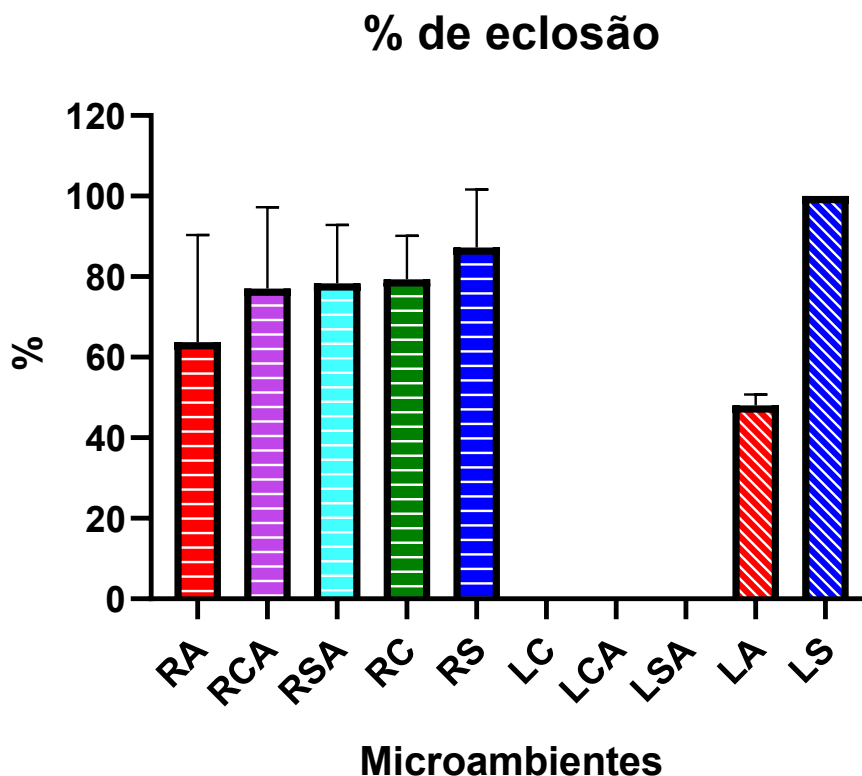


Figura 18: Porcentagem de eclosão dos grupos experimentais. RC = Ração e carbonato de cálcio, LC = Alfaca e carbonato de cálcio, RA = Ração e argila, LA = Alfaca e argila, RS = Ração e sais, LS = Alfaca e sais, RCA = Ração, carbonato de cálcio e argila, LCA = Alfaca, carbonato de cálcio e argila, RSA = Ração, sais e argila, LSA = Alfaca, sais e argila entre os dias 62 ao dia 119.

Em relação a significância estatística do percentual de eclosão, podemos observar que o grupo RCA foi relevante em relação ao grupo LC, LCA e LSA com  $P=0,0082$ ,  $P=0,0082$  e  $P=0,0082$ , é importante salientar que o LC não apresentou eclosão devido a morte de todos os indivíduos e os grupos LCA e LSA não apresentaram oviposição durante o período de 119 dias de experimento, dessa forma, não foi possível aferir sua taxa de eclosão.

Em relação ao grupo RSA, a significância estatística do percentual de eclosão foi relevante em relação ao grupo LC, LCA e LSA com  $P=0,0086$ ,  $P=0,0086$  e  $P=0,0086$ , lembrando que o LC não apresentou eclosão devido à morte de todos os indivíduos, e os grupos LCA e LSA não apresentaram oviposição durante o período de 119 dias, não sendo possível aferir sua taxa de eclosão.

Em relação ao grupo RS a significância estatística do percentual de eclosão foi relevante em relação ao grupo LC, LCA e LSA com  $P=0,0014$ ,  $P=0,0014$  e  $P=0,0014$ .

Em relação ao grupo RC a significância estatística do percentual de eclosão foi relevante em relação ao grupo LC, LCA e LSA com  $P=0,0200$ ,  $P=0,0200$  e  $P=0,0200$ .

Em relação ao grupo LS a significância estatística do percentual de eclosão foi relevante em relação ao grupo LC, LCA e LSA com  $P=0,0022$ ,  $P=0,0022$  e  $P=0,0022$ .

Lembrando que o LC não apresentou eclosão devido a morte de todos os indivíduos, e os grupos LCA e LSA não apresentaram oviposição durante o período de 119 dias, não sendo possível aferir sua taxa de eclosão por isso esses grupos apresentaram significância estatística em relação aos grupos anteriores: RS, RC e LS.

Em comparação a diferentes substratos dentro da mesma alimentação de ração de peixe não houve diferenças em relação a significância estatística no percentual de eclosão entre os grupos RSA, RCA, RS, RA e RC quando comparados entre si. Todavia a comparação do percentual de eclosão dos substratos dos animais alimentados por alface não foi levada em consideração devido haver somente dois grupos viáveis para essa comparação (LA e LS), pois os outros grupos ou não realizaram a oviposição (LCA e LSA) ou vieram a morrer no início do experimento (LC).



## 5. Discussão

### 5.1 Mortalidade

Conforme observado nos resultados obtidos, houve uma gradual taxa de mortalidade ao longo do tempo de experimento nos grupos RA, RS, LCA, LSA. Em alguns grupos essa mortalidade pode ser associada a densidade populacional, conforme observado por Augusto (2012), onde em seus experimentos os grupos que apresentavam alta densidade populacional tiveram a sobrevivência de apenas 21% dos caramujos, e grupos com menores densidades apresentaram sobrevivência de 90%. Esse aumento da densidade populacional de molusco pode significar um efeito negativo na diminuição da sobrevivência dos animais.

Segundo Lande et al. (2002), a densidade populacional intraespecífica na natureza é um fator ecológico crítico que afeta diretamente o crescimento, sobrevivência e fecundidade de caramujos tendo consequências negativas na dinâmica da população e na manutenção.

Os efeitos observados nesses moluscos mantidos em altas densidades populacionais podem ser resultado da concorrência intraespecífica por recursos alimentares, depleção de oxigênio e / ou de cálcio e da consequente produção de produtos/ metabólitos que inibem o crescimento na água. (MANGAL et al., 2010).

Foi possível observar que no grupo LSA, onde havia alta densidade populacional com N=45, o crescimento foi diretamente afetado – o que interferiu na aferição do peso e tamanho dos caramujos durante grande parte do experimento. Além disso, o fator “crowding” interferiu na fecundidade e fertilidade dos moluscos, uma vez que não houve postura durante todo o período de 119 dias. Dessa forma, não foi possível aferir a fecundidade e fertilidade desse grupo. Adicionalmente, observou-se que após 84 dias houve a mortalidade de 35% dos animais do grupo.

Outro fator a ser considerado interferente na mortalidade segundo Selck (2006) é a alimentação. Em experimento realizado entre 3 grupos alimentares

(com alface alginato e mix de caracol e alginato e mix de ração de peixe) foram observados que a maior taxa de mortalidade foi observada no grupo privado de alimento, ocorrendo 100% de mortalidade dos caramujos juvenis em ambos os 3 grupos dos experimentos nos primeiros 9 dias. Enquanto a mortalidade foi de 100% com baixo teor de alface, mortalidade, enquanto a dieta com baixa teor de outros alimentos se manteve com nenhuma ou pouca mortalidade durante esses primeiros dias (SELCK, 2006).

Em nossas análises, foi possível observar que os grupos dos animais alimentados com ração de peixe tiveram baixa mortalidade ao longo do experimento: grupo RC com 3,3%, RS com 23%, RCA 0% e RSA com 11,1% quando comparados com o grupo LCA, o grupo controle, que registrou mortalidade de 75%.

Segundo Chieffi (1975) em seus trabalhos também foi observado que exemplares recém eclodidos e que foram alimentados com ração de peixe tiveram menor índice de mortalidade. Por outro lado, a dieta constituída por alface mostrou-se ineficaz para assegurar níveis adequados de sobrevivência de animais recém eclodidos, quando comparada a dietas ricas em proteína.

Segundo Augusto (2012), outro fator a ser considerado para a sobrevivência dos caramujos é a diferença da concentração de carbonato de cálcio. Em seus experimentos com moluscos *B. glabrata*, o autor observa menor mortalidade utilizando a concentração de 0,8mg/L. Em nossas análises onde foi utilizado 1g/L de carbonato de cálcio, foi possível observar que os grupos alimentados com ração de peixe que obteve a mortalidade mais expressiva foi aquele cujo substrato não havia carbonato de cálcio. Dessa forma, grupo RA obteve uma mortalidade de 63,1% enquanto os grupos RC 3,3%, RS 23%, RCA 0%, RSA 11,1%.

## 5.2 Desenvolvimento

Na natureza outro fator que vem a interferir na taxa de crescimento e na aptidão reprodutiva dos caramujos é o conteúdo energético, composição de nutrientes e comestibilidade de seus alimentos, como também a digestibilidade e absorção do alimento pelo trato digestivo (THOMAS et al., 1983; MCSHANE et al., 1994; FOSTER et al., 1999). A seleção de uma dieta adequada é, portanto, um parâmetro indispensável na criação de caramujos para vir a ser bem-sucedida (SELCK, 2006).

Nos animais que tiveram a ração de peixe como alimentação, apresentaram melhor desenvolvimento em relação ao peso e tamanho. Após 126 dias aparecem em ordem de desenvolvimento o grupo RCA, RA, RSA, LA e RC, mostrando que os principais grupos com maior desenvolvimento, entre os citados, são alimentados por ração de peixe.

Foi observado que, em relação ao controle LCA, todos os demais grupos alimentados com ração de peixe apresentaram significância estatística em algum momento durante o experimento, sendo os mais notáveis os grupos RCA, RA e RSA. Em comparação ao grupo controle, o grupo RCA que possui o mesmo substrato, apenas variando a alimentação, demonstra que o substrato (em relação a esses dois grupos estudados) não influenciou o desenvolvimento, demonstrando o efeito da alimentação no desenvolvimento de RCA.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, o grupo RSA (alimentado com ração de peixe), quando comparado ao grupo LSA (alimentado com alface e mesmo substrato em comum), apresentou melhor desenvolvimento.

Segundo Chieffi (1975) foi observado que exemplares recém eclodidos e alimentados com ração de peixe obtiveram, maior índice de crescimento, também atingindo maturidade sexual mais rapidamente. Já indivíduos alimentados com alface foi observado menores índices de crescimento e oviposição, corroborando com os dados desse artigo.

Em outros trabalhos, maiores taxas de crescimento foram encontradas em caramujos alimentados com alface e coração de cordeiro (DORGELLO et al.,

1995), demonstrando a importância de uma dieta proteica. No entanto no ambiente marinho, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente limitante, não apenas para a produção de plantas, como também para os herbívoros que consomem alimentos vegetais (BARILE et al., 2004). Evidências crescentes sugerem que invertebrados que se alimentam de macroalgas com maiores teores de nitrogênio (HAUXWELL et al., 1998; YATES & PECKOL 1993: citados em BARILE et al., 2004.) E que o maior teor de nitrogênio está positivamente relacionado à taxa de crescimento (BARILE et al., 2004).

Quanto ao substrato, em relação aos grupos alimentados com ração de peixe, os grupos RCA, RSA e RA apresentaram desenvolvimento e todos esses apresentavam argila em comum. Em comparação aos substratos e com alface como alimentação, foi observado que o grupo LCA apresentou melhor desenvolvimento que o grupo LSA (esses grupos também apresentam argila em sua composição). Quanto aos grupos LC, LS e LA, as análises não foram realizadas já que houve mortalidade total ou baixo desenvolvimento desses grupos.

O grupo RCA obteve maior desenvolvimento tanto em relação ao peso e tamanho. Isso pode ser justificado pela alimentação, já que este grupo foi alimentado com ração. No entanto, o grupo LA apareceu na quarta posição (entre os grupos estudados) sendo alimentado com alface, indicando que não só a alimentação pode vir a influenciar no desenvolvimento, como também a densidade populacional, já que nesses grupos apresentava uma densidade populacional baixa. Na natureza a densidade populacional intraespecífica é um fator ecológico crítico que afeta diretamente o crescimento, tendo consequências negativas na dinâmica da população e na manutenção (Mangal et al. 2010).

Quando se compara o grupo RCA com o LA podemos observar que os dois grupos apresentam, apesar de serem submetidos a alimentações diferentes, apresentam uma baixa densidade durante todo o desenvolvimento. O grupo RCA apresentou N=4 e LA N=1, vale lembrar que o grupo RCA era o mais expressivo no desenvolvimento de tamanho e peso, após a eclosão e após 48 dias, vindo a se tornar o mais expressivo de todo o experimento.

Podemos observar que o grupo RA que ficou na segunda posição nos primeiros 48 dias. Apresentando desenvolvimento similar a todos os demais grupos. Seu desenvolvimento vai se tornando mais expressivo conforme vai havendo maior mortalidade dos indivíduos do grupo e consequente diminuição na densidade populacional da caixa (que passa de N=19 para 7 caramujos).

Do mesmo modo, a densidade populacional também poderia ser o motivo do crescimento dos animais dos grupos LA e LS, onde a densidade populacional se manteve baixa por todo período de experimento. Tal fato justificaria o ganho de tamanho e peso dos caramujos pertencentes a esses grupos alimentados com alface – já que quando comparado com o grupo LSA onde também foi alimentado com alface houve uma alta densidade populacional com 45 indivíduos inicialmente e 29 no último dia, o desenvolvimento desse grupo se mostrou tão baixo que não foi possível nem fazer as contagens de tamanho e peso nas primeiras aferições.

Em relação ao grupo RC, alimentado com ração, foi observado baixo desenvolvimento dos indivíduos do grupo em relação ao peso. Tal situação pode ser justificada pela densidade mais elevada durante todo o experimento N=26 - 20.

Outro fator que se pode observar é disponibilidade de alimentos em alguns grupos. Os grupos que tiveram menor densidade populacional passaram a ter maior disponibilidade alimentar, já que a quantidade de ração se encontrava fixa. Nesses grupos podemos justificar um melhor desenvolvimento nos grupos RCA durante todo o experimento, pois teve uma baixa densidade durante todo o período experimental, com isso maior disponibilidade alimentar, O grupo RA, que durante os últimos dias teve uma mortalidade em sua população, aumentando assim a disponibilidade de alimento, LA, LS, que em todo período de experimento teve uma densidade populacional baixa, também tendo maior disponibilidade de alimento e LCA o qual também apresentou baixa densidade populacional.

Segundo Selck (2006) as taxas de crescimento juvenil aumentaram com o aumento da frequência de alimentação, independentemente do tipo de alimento. Nesses grupos citados anteriormente mesmo que não houvesse

aumento de frequência de alimentação, o alimento ficava mais disponível para determinados grupos, havendo uma quantidade maior de alimento por caramujo. Selk (2006) justifica que os grupos onde a frequência de alimentação é baixa, é observado que crescimento médio é maior. Tal situação ocorreu em experimentos onde o maior crescimento médio é observado para os caracóis alimentados com alginato com ração para peixes, enquanto na frequência de alimentação alta, diferente dos nossos resultados, os caracóis alimentados com alface cresceram mais rápido. Nesses resultados Selk (2006) afirma que a alface foi pior dos alimentos testados se fornecida em quantidades limitadas.

Akerlund (1969) sugeriu que os moluscos esgotam rapidamente suas reservas nutricionais. Durante o jejum, os indivíduos esgotam seus estoques de carboidratos duas vezes mais rápido do que seus estoques de proteína, enquanto a diminuição de lipídios parece ser relativamente pequena (Horne 1979). Em seu estudo juvenis de *Marisa cornuarietis*, tais animais não conseguiram sobreviver por 49 dias na ausência de alimento. Embora a alface tenha apresentado as melhores taxas de crescimento quando fornecida em alta frequência, a mortalidade era elevada se os caramujos fossem alimentados em baixa frequência com esse alimento.

### 5.3 Fertilidade e fecundidade

Os estoques de energia são usados principalmente para manter as funções vitais e o excesso é direcionado para o crescimento. Após a maturidade sexual, o crescimento desacelera para que todo o excesso de energia possa ser alocado para as funções reprodutivas (CARVALHO et al., 2008).

Podemos observar em nosso experimento, a relação entre a alimentação e a fertilidade e fecundidade nos grupos RC, RA, RCA e RSA (grupos esses alimentados com ração de peixe), que a oviposição foi prematura ao 62º dia em relação ao grupo controle (grupo esse alimentados por alface). Os grupos RC e RA destacaram-se por apresentar maior postura conforme demonstrado nos gráficos anteriores (figura 10 e 12).

Todavia o grupo LA, cuja alimentação foi constituída por alface, apresentou oviposição expressiva no último dia de análise. Talvez isso pode ser atribuído ao fato de termos um limitado tempo de experimento, não tornando possível saber se após um certo período de tempo os valores dos grupos alimentados com alface poderiam se tornar mais competitivo em relação aos grupos alimentados com ração de peixe, devido a esse curto período não foi possível observar se esses valores seriam capazes de se equiparar no futuro. Tendo a necessidade de novos experimentos para melhor observar esses resultados

Como constatado anteriormente, o grupo RCA e RSA produziram maior número de ovos por massa ovígera em comparação ao grupo RA. Já os grupos RCA e RSA produziram massas ovígeras maiores. Nos grupos RCA, RSA e RA aos 119 dias havia uma relação superior a 25 ovos/massa, enquanto LA e LS 10 ovos /massa ovígera, ou seja 2,5 vezes a mais que grupos alimentados com alface.

No entanto, não só a alimentação pode vir a ser considerada como um fator de interferência na fecundidade, Augusto et al. (2012) observou em seu trabalho que grupos com menor densidade populacional produziram mais ovos por molusco (como é o caso do grupo RCA, RA e LA, que apresentaram um N de 4, 7 e 1 no último dia de experimento). No entanto, havia uma diferença significativa em relação aos ovos colocados por caramujos, os grupos com menor densidade populacional diferem significativamente dos grupos com maior densidade populacional. A relação entre densidade populacional e número de ovos por massa de ovos indica uma possível influência negativa da quantidade de animais no ambiente/recinto na reprodução dos moluscos (AUGUSTO et al., 2012).

O aumento da densidade populacional tem um efeito negativo na atividade reprodutiva de *B. glabrata*. De acordo com Lande et al. (2002), na natureza a densidade populacional intraespecífica é um fator ecológico crítico que afeta diretamente o crescimento, sobrevivência e fecundidade dos moluscos com aumento da densidade, ocorre consequências negativas na dinâmica da população e na manutenção. Aufderheide et al. (2005) também descobriram que o tempo para a maturidade sexual foi retardado com a diminuição da temperatura

e com o aumento da densidade dos caramujos, mostrando que interferências multifatoriais influenciam no desenvolvimento dos animais. Mangal et al. (2010) sugeriram que os efeitos observados em *B. glabrata* mantidos em altas densidades podem ser decorrentes da competição por recursos alimentares, depleção de oxigênio e / ou cálcio e da produção de produtos inibidores do crescimento ou de produtos tóxicos dispersos na água.

Em *B. glabrata*, outro fator limitante é o cálcio, que tem influência direta no crescimento da concha, fecundidade, oviposição, sobrevivência e manutenção do metabolismo interno, atuando como sistema tampão. O cálcio está localizado principalmente na concha e na glândula digestiva (WILBUR & TOMPA, 1979).

O cálcio no ciclo de vida dos moluscos é essencial, pois promove a formação da concha (MARXEN et al., 2003), funciona como solução tampão em processos metabólicos e participa da produção de células (os hemócitos) de defesa dos moluscos, além de influenciar na sua capacidade fagocítica (ZELCK et al., 1995). Esse íon também afeta a resposta imune dos gastrópodes, uma vez que a atividade fagocítica dos hemócitos e de outras células de defesa dependem da presença desses íons na hemolinfa (SOUZA E ANDRADE, 2006).

Tanto o crescimento como a taxa de postura são influenciados pela concentração de cálcio que os moluscos absorvem por meio de sua dieta no ambiente em que vivem. Na hemolinfa de *B. glabrata*, o cálcio é destinado às várias partes do organismo desse molusco como: tecidos, hemolinfa, manto e concha, nesta última sob a forma de cálcio sólido. Este íon atua em diversos sítios, sendo primordial na regulação eletroquímica do molusco e contribui para a sua homeostase. O equilíbrio de cálcio na hemolinfa e na concha é regulado por uma taxa de excreção e circulação (FLORKIN & SCHEER, 1972).

Entretanto estudos complementares são necessários para determinar a quantidade de cálcio necessária para manter a melhor forma de criação desse molusco, já que aparentemente não foi determinada a quantidade adequada. Aparentemente em nosso trabalho podemos notar uma peculiaridade em relação ao cálcio, já que aparentemente o grupo não exposto ao carbonato de cálcio (RA) foi o grupo que apresentou o maior número de ovos/moluscos, no entanto



ele cai de posição para terceiro quando comparado em relação ao número de ovos férteis/molusco, sendo do superado pelos grupos RCA, que foi exposto a carbonato de cálcio e ao grupo RSA grupo esse que foi exposto ao mix contendo carbonato de cálcio.

Em outras condições de estresse fisiológico, como: infecção, jejum, estivação e tratamento com moluscidas, os moluscos também alteram o metabolismo de carboidratos e de proteínas. Promovem, então, a liberação de ácidos orgânicos altamente tóxicos que serão neutralizados pela mobilização de carbonato de cálcio que são excretados ou metabolizados em outros tecidos (BECKER, 1980; LIEBSCH & BECKER, 1990; MELLO-SILVA ET AL., 2006).

O cálcio é incorporado no ciclo metabólico e seu excesso é depositado na concha e nas células do corpo (DEWITH & SMINIA, 1980). Em caramujos, a concentração de cálcio na hemolinfa permanece elevada, mesmo se a disposição no ambiente for baixa, segundo Greenaway (1971) e Grospietsch et al. (2000).

Segundo Magalhães et al, (2011) quanto maior a quantidade de carbonato de cálcio, maior era a mobilização para a hemolinfa, aumentando a disponibilidade de cálcio. É provável que o excesso de cálcio fique armazenado em células dispostas nos espaços intercelulares no epitélio, em células de produção de muco no manto e em células musculares descritas como sítio de deposição em *B. glabrata* (BIELEFELD et al., 1992).

Segundo Dewith & Sminia (1980), a alta concentração de cálcio na hemolinfa faz com que este produto seja distribuído para a concha e o manto, acontecendo o inverso se a maior concentração de cálcio estiver na concha do molusco. Este equilíbrio na distribuição de cálcio na hemolinfa e na concha é pH dependente e está relacionado à disponibilidade de cálcio no meio (MARXEN & BECKER, 2000; MAGALHÃES et al, 2011). Nestes caramujos, o cálcio influencia diretamente a composição da concha, fecundidade, oviposição, sobrevivência, desenvolvimento de ovos e embriões, mortalidade e manutenção da homeostase interna (THOMAS et al., 1974; DAWIES & ERASMUS, 1984; MAGALHÃES et al., 2011).

Quando os caramujos são mantidos sob fatores de estresse fisiológico, o cálcio é mobilizado da concha para a hemolinfa na forma de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que se decompõe, levando à formação de um sistema tampão de bicarbonato, preservando assim a homeostase do organismo (DE WITT & SMINIA, 1980; MAGALHÃES et al., 2011). O cálcio é frequentemente adicionado à dieta de caramujos criados em laboratório, mas não há estudos sobre a proporção ideal de cálcio por litro de água para otimizar sua sobrevivência.

Os caramujos obtêm íons de cálcio de seus alimentos e a falta de recursos de cálcio no ambiente pode limitar o crescimento das populações, pois esse íon é essencial para a formação da casca do ovo e da casca embrionária (Davies & Erasmus, 1984). Outro fator que vem a interferir na taxa aptidão reprodutiva dos caramujos é o conteúdo energético, composição de nutrientes e comestibilidade de seus alimentos, bem como digestibilidade e absorção do alimento pelo trato digestivo (THOMAS et al., 1983; MCSHANE et al., 1994; FOSTER et al., 1999). A dieta adequada é, portanto, um parâmetro chave para o sucesso da criação de caramujos (SELCK, 2006).

Entretanto foi possível observar que o grupo RA (que não possui carbonato de cálcio como substrato) produziu maiores valores de massa ovígera/molusco e ovos/molusco que os grupos RCA, RSA, RS e RC. Já os grupos RCA e RSA obtiveram maiores quantidades de ovos/massa ovígera, e maior fertilidade, tendo mais ovos eclodidos e maior porcentual de eclosão.

No estudo de fecundidade, os grupos que foram alimentados por ração de peixe produziram maior número de ovos por molusco, ovos por massa ovígera e ovos por moluscos quando comparados aos animais alimentados com alface. É provável que esses grupos RCA RSA e RA obtiveram esses parâmetros maiores devido ao maior peso e tamanho desses animais, uma vez que tais variáveis podem influenciar na quantidade de ovos e tamanho da massa ovígera, algo a ser considerado na análise. No entanto em relação a fertilidade, o tamanho e peso aparentemente não influenciam diretamente na eclosão.

No entanto, é evidenciado que os grupos alimentados com ração possuem maturação sexual precoce e uma maior oviposição, conforme ocorreu nos grupos RA e RCA e puseram por volta de 100 e 97 ovos por moluscos

enquanto os grupo LA que foi o com maior oviposição alimentados por alface, ovipôs por volta de 9 ovos.

Segundo Estoy (2002), a maturidade sexual parece ser alcançada mais rapidamente alimentando-se continuamente os moluscos juvenis com alface em abundância e como única fonte de alimento. O cálculo do tempo até a maturidade morfológica pressupõe que é determinado pelo tamanho e não a idade no momento que os caramujos atingem a maturidade. No entanto, o efeito do nível de alimento no tamanho e na idade na primeira reprodução, bem como nas características reprodutivas, foi evidenciado no caramujo-maçã (*Pomacea canaliculata*) LAMARCK 1819 (ESTOY et al., 2002). Verificou-se que o nível de alimento afetou o tamanho, mas não a idade da primeira cópula nos machos. Em contraste, o nível de alimento afetou o tamanho e a idade da fêmea na primeira cópula e desova (ESTOY et al., 2002). Embora a frequência da cópula não tenha sido afetada pelo nível de alimento em machos ou fêmeas, a produção de desova e o número de ovos por desova foram maiores para aquelas fêmeas alimentadas com o nível de alimento mais alto em comparação com aquelas alimentadas com o nível de alimento mais baixo (ESTOY et al., 2002).

Segundo Chieffi (1975) as taxas de crescimento e fecundidade estão relacionadas a uma dieta proteica, Eveland e Ritchie (1963) afirmam que uma dieta constituída apenas por alface não é suficiente para assegurar as condições necessárias para o desenvolvimento adequado dos caramujos.

Chieffi (1975) demonstra em seu trabalho que dietas ricas em proteínas foram capazes de promover maior crescimento e aumento da fecundidade, sendo superior aos alimentados com alface em planorbídeos.

Segundo Chieffi (1975) foi observado que espécimes recém eclodidos e que foram alimentados com ração de peixe obtiveram menor índice de mortalidade (aproximadamente 35%), maior índice de crescimento, e conseqüentemente atingindo maturidade sexual de maneira mais rápida. Todavia, indivíduos alimentados com a alface foi observado menores índices de oviposição, sendo 45,75% a mais que alface quando alimentado com alfafa e farinha de carne e 89,3% que alface a mais quando alimentado com alfafa e farinha de carne. Em nosso trabalho foi observado que os caramujos

alimentados com ração de peixe apresentaram menor mortalidade e maior índice de crescimento. Esses grupos alimentados por ração de peixe também atingiram a maturidade sexual mais rapidamente e assim obtiveram maior oviposição, corroborando com Chieffi (1975).

## 6. Conclusão

- A alimentação com ração de peixe promove maior desenvolvimento, em relação a peso e tamanho, dos caramujos.
- A argila foi o substrato presente nos três grupos onde houve melhor desenvolvimento dos animais.
- Os animais submetidos à maior densidade populacional foram aqueles que apresentaram maior mortalidade ao longo do experimento. Dessa forma, a densidade populacional seria um fator que interfere negativamente na manutenção/desenvolvimento de colônias de caramujos em laboratório.
- Animais alimentados com ração de peixe apresentaram maturidade sexual mais precoce (apresentando maiores quantidades de ovos por caramujo, massa ovígera maior e a relação de ovos/ massa ovígera). Tal aumento poderia ser justificado pelo rápido ganho de peso que gerou maturação sexual prematura e conseqüente aumento na fecundidade.
- O peso e tamanho dos caramujos parece não interferir na quantidade de ovos férteis, sendo a alimentação a variável mais importante que influenciaria esse parâmetro.
- A composição de nutrientes influencia o desenvolvimento dos caramujos (mortalidade, taxa de crescimento e produção reprodutiva) e a escolha de uma dieta apropriada é, portanto, fundamental para manter culturas de estoque de caramujos bem-sucedidas em laboratório.

- A alimentação com ração vem a ser mais vantajoso, uma vez que os caramujos de laboratório se desenvolvem mais rapidamente, otimizando o tempo da criação e recursos, gerando a diminuição de custos, o que torna economicamente mais vantajoso.
  
- Há necessidade realização de estudos complementares para melhor compreensão dos fatores que levaram à mortalidade dos indivíduos durante o experimento. Como também, compreender a necessidade do carbonato de cálcio no desenvolvimento do animal, uma vez que o molusco obteve desenvolvimento considerável em relação ao tamanho, e na fecundidade, Massa/molusco e ovos/molusco, porém sua concha se encontrava sem rigidez havendo necessitante dessa forma, dosagem do cálcio armazenado na concha.

## 7. Referências

ABÍLIO, F.J.P.; RUFFO, T.L.M.; SOUZA, A.H.F.F.; FLORENTIN, H.S.; JÚNIOR, E.T.O.; MEIRELES, B.N.; SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 397-409, 2007.

AKERLUND G. Oxygen consumption of the ampullariid snail *Marisa cornuarietis* L. in relation to body weight and temperature. *Oikos* v. 20, p.529–533, 1969.

AUFDERHEIDE J.; WARBRITTON, R.; POUNDS, N.; FILE-EMPERADOR, S.; STAPLES, C.; CASPERS, N.; FORBES, V.E. The effects of husbandry parameters on the life-history traits of *Marisa cornuarietis*: effects of temperature, photoperiod and population density. **Invertebr. Biol.** V. 125, p.9–20, 2005.

AUFDERHEIDE, J.; POUNDS, N.; CASPERS, C.S.N.; FORBES, V. Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda). **Invert Biol.** V.125, p.106-116, 2006.

AUGUSTO, R. C.; FRIANI, G. V.; VASCONCELLOS, M. C.; RODRIGUES, M. L. A.; MELLO-SILVA, C. C. Schistosoma mansoni: phytochemical effect on aquatic life cycle. **Open Journal Veterinary Medicine**, Taipei, v. 5, p. 127-132, 2015.

AUGUSTO, R.C.; MAGALHÃES, A.C.S.; MELLO-SILVA, C.C. The influence of population density and food intake on the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) and calcium proportion in snails experimentally infected with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 1, p. 83-92, 2012.

BARBOSA, F.S. & BARBOSA, C.S. The Bioecology of Snail Vectors for Schistosomiasis in Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 200-209, 1994.

BARILE, P.J.; LAPOINTE, B.E.; CAPO, T.R. Dietary nitrogen availability in macroalgae enhances growth of the sea hare *Aplysia californica* (Opisthobranchia: Anaspidea). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v .303, p.65–78, 2004.

BARNES, R.D; RUPPERT, E.E; FOX, R.S. Zoologia dos Invertebrados. 7a edição, Editora, Roca, p.1146 2005,

BASCH, P.F. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* v. 39, n. 1, p. 150-69, 1976.

BECKER W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and mollusks, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Z. Parasitenkd* v. 63, p. 101-111, 1980.

BIELEFELD, U.; ZIEROLD- KORTJE, K.H.; BECKER, W. Calcium localization in the shell-forming tissue of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: a comparative study of various methods for localizing calcium. *Histochemical* v. 24, p. 927-938, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. **Diretrizes técnicas.** 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CAMPBELL, G.; JONES, C.S.; LOCKYER, A.E.; HUGHES, S., BROWN, D.; NOBLE, L.R.; ROLLINSON, D. Molecular evidence supports an African affinity of the neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Royal Society**, v. 267, n. 1460, 2000.

CARVALHO, O.S.; AMARAL, R.S.; DUTRA, L.V.; SCHOLTE, R.G.C.; GUERRA, M.A.M. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: OS Carvalho, PM Zech Coelho, HL Lenzi (eds.), *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Editora Fiocruz**: Rio de Janeiro. p. 1124, 2008.

CHIFF, P.P. Influência do tipo de alimentação sobre o crescimento, maturação sexual, sobrevivência e oviposição de *Biomphalaria glabrata* (MOLUSCA, Planorbidae). **Ver. Pat. Trop.**, v. 4, n. 2, p. 91-99, 1975.



COSTA, M.J.F.S.; RAULT, C.E.; CONFALONIERI, U.E.C. Estudo comparativo da fecundidade e fertilidade de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) em um laboratório através de autofertilização e fertilização cruzada. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 157-163, 2004.

DAWIES, T.W.; ERASMUS, D.A. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Research**, v. 236, p. 643-649, 1984.

DAWIES, T.W.; ERASMUS, E.D. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Research** v. 236, p. 643-649, 1984.

DE JONG, R.J.; INCANI, R.N.; KAWANO, T.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N.J.; MIMPFOUNDI, R.; NJIOKOU, F.; NOËL PODA, J.; SENE, M.; VELÁSQUEZ, L.E.; YONG, M.; ADEMA, C.M.; HOFKIN, B.V.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S.E. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Mol Biol Evolution**, v. 18, p. 2225-2239, 2001.

DE WITT, N.D.; SMINIA, T. The effects of the nutritional state and the external calcium concentration on the ionic composition of the hemolymph and on the calcium cells in the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Proc K Ned Akad Wet**. v. 83, p. 217-227, 1980.

DORGELO, J.; MEESTER, H.; VAN VELZEN, C. Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). **Hydrobiologia** v. 316, p 199–210, 1995.

ESTOY, G.F.; YUSA, Y.; WADA, T.; SAKURAI, H. TSUCHIDA, K.; Effects of food availability and age on the reproductive effort of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck) (Gastropoda: Ampullariidae). **Appl. Entomol. Zool**. v.37, p. 543–550, 2002.

EVELEND, L. K.; RITCHIE, L. S. Infectivity of cercariae of *Schistosoma mansoni* from snails on inadequate diets. **Parasitology**. v. 64, p. 441-4, 1963.

FARO, M.J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L.R.; MELLO-SILVA, C.C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E.M.; SOUZA, S.; ANDRADE, Z.; JÚNIOR, A.M. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 134, p.228-234, 2013.

FLORKIN M & SCHEER BT. Chemical Zoology. V. 2. New York, **Academic Press**, 1972.

FOSTER, G.G.; HODGSON, A.N.; BALARIN, M. Effect of diet on growth rate and reproductive fitness of *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vegigastropoda: Turbinidae). **Mar. Biol.** 134: 307–315, 1999.

GREENAWAY, P.; Calcium regulation in the freshwater mollusc *Lymanaea stagnalis* (L) (Gastropoda; Pulmonata). I. The effect of internal and external calcium concentrations. **J Exp Biol** v.54, p. 199-214, 1971.

GROSPIETSCH, T.; SITNIKOVA, T.Y.; ZERBST-BOROFFKA, I. Comparison of calcium storage between a Baikalian gastropod and holarctic relatives. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. V. 125, p. 273-283, 2000.

HAUXWELL, J.; MCCLELLAND, J.; BEHR, P.J.; VALIELA, I. Relative importance of grazing and nutrient controls of macroalgal biomass in three temperate shallow estuaries. **Estuaries** v. 21(2), p. 347–360, 1998.

HORNE, F.R. Comparative aspects of estivating metabolism in the gastropod, *Marisa*. **Comp. Biochem. Physiol**. V.64, p. 309–311, 1979.

LANDE, R.; ENGEN, S.; SAETHER, B.E. Estimating density dependence in time-series of age-structured populations. **Phil Trans R Soc**. v. 357, p.1179-1184, 2002.

LIEBSCH, M.; BECKER, W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. **J Comp Physiol**. v.166, p. 41-50, 1990.

MADSEN, H.; FRANDBSEN, F. The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. **Acta tropica**, v.46, p.139-146, 1989.

MAGALHÃES, A.C.S.; 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.

MAIA, KEILA. Genoma de caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* é sequenciado. Portal fiocruz, 2017. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/genoma-de-caramujo-transmissor-do-schistosoma-ansoniesequenciado#:~:text=Um%20artigo%20publicado%20na%20Nature,24%20milh%C3%B5es%20de%20pessoas%20em>>. Acesso em: 03, 03 de 2021.

MANGAL, T.D; PATERSON, S; FENTON, A. Effects of Snail Density on Growth, Reproduction and Survival of *Biomphalaria alexandrina* Exposed to *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol Res**, v.1, p. 1-6, 2010.

MARTINS-SOUZA, R. L. **Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção por *Schistosoma mansoni***. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2006.

MARXEN JC, BECKER W. Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Comp Biochem Physiol Part. V.** 127, p. 235-242, 2000.

MARXEN, J.C.; BECKER, W.; FINKE, D.; HASSE, B.; EPPLE, M. EARLY mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. **J Moll Stud.** V. 69, p. 113-121, 2003.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L. A Physiological change in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the látex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 10, n.1, p. 3-8. 2006.

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

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR, M.M.; VASCONCELLOS, M.C.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations on the *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopia* latex. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V.105, p. 492-495, 2010.

ODUM, E.P. **Ecologia.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 446 p.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo do Museu Nacional.** V.55, p.105-111, 1975.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. **In:** LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G. & SIQUEIRA Jr., W. Introdução à geografia médica do Brasil. **Ed. Edgar Blucher/ EDUSP,** p. 213- 239,1972.

PARAENSE, W. L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. **In:** CARVALHO, O.S.; COELHO P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 285-308, 2008.

PARAENSE, W.L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 53, p. 277, 1955.

PARAENSE, W.L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. "In": CUNHA, A.S. Esquistossomose Mansonii: Por um grupo de colaboradores especializados. São Paulo, **Sarvier/Edups.**Cap. II, p. 13-30, 1970.

PARAENSE, W.L; CORRÊA, L.R. Susceptibilidade de *Biomphalaria peregrina* do Brasil e Equador para duas linhagens de *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop,** São Paulo, v. 15, p. 127-130, 1973.

PIERI, O. S; Aspectos Ecológicos. In: AMARAL, R.S; THIENGO, S. C; PIERI, O; (Org) Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica- Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2008. 37-41.

PIERI, O.S. Aspectos Ecológicos. In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: **Diretrizes técnicas**: Programa de Vigilância controle da esquistossomose (PCE). Ministério da Saúde, Brasília, v. 3, p. 37-40, 2008.

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; SOUZA, C.P.; BAPTISTA, D.F. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *Hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Am J Trop Med Hyg.** V.58, p.7-10, 1998.SELCK, H.;

SILVA, A.C.A. **Alterações locomotoras e reprodutivas em *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) (Mollusca: Planorbidae) hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae) sob condições de estresse.** Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, RJ, 2016.

SILVA, L.D. **Influência da exposição ao carbonato de cálcio no metabolismo de compostos orgânicos e inorgânicos em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro de *Schistosoma mansoni*.** Dissertação de mestrado, p.90., 2014.

SILVA, P.B.; BARBOSA, C.S.; PIERI, O.S.; TRAVASSOS, A.; FLORENCIO, L. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. **Quim Nova.** V.29, p.901-906, 2006.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Centro de Pesquisa "René Rachou"/Fiocruz, Belo Horizonte. V.76, p. 79, 1990.

SOUZA, N S. **Efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) sobre a reprodução de *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (gastropoda: pulmonata):um estudo multigeração**.p. 84. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, 2020.

SOUZA, S.S.; ANDRADE, Z.A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.101, p.213-218, 2006.

TEODORO T.M., et al., Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). **Mol Phylogenet Evol**. V. 57, p.144-151, 2010

THIENGO, S. C; FERNANDEZ, M. A. MOLUSCOS. IN: AMARAL, R.S; THIENGO, S. C; PIERI, O. (Org) Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica- Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2008. 13-35.

THOMAS, J.D.; BENJAMIN, M.; LOUGH, A.; ARAM, R.H. The effects of calcium in the external environment on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say). **J Anim Ecol**. v.43, p.839-860, 1974.

THOMAS, J.D.; GREALY, B.; FENNELL, C.F. The effects of varying the quantity and quality of various plants on feeding and growth of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **Oikos**. V.41, p.77–90, 1983.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; MELLO-SILVA, C.C.C.; MALDONADO-JÚNIOR, A.; RODRIGUES, M.L.A.; PINHEIRO, J. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p. 192–195, 2011.

WILBUR, K.; TOMPA, A.S. Physiological changes in Gastropods during egg shell calcification. **Malacologia**. V.18, p.561-562, 1979.

World Health Organization. Schistosomiasis. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en>, 2015.

YATES, J.L.; PECKOL, P. Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. **Ecology**. V.74, p.1757-1766, 1993.

ZELCK, U.E.; BECKER, W.; BAYNE, C.J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. **Dev Comp Immunol**. v.19, p.181-194, 1995.