

Avaliação da biologia reprodutiva de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos a diferentes tipos de alimentação e substratos

Walter César Góes Valente ^{1,2*}

Juberlan Silva Garcia ³

João de Mello Rezende Neto ¹

Giuliana Viegas Schirato ¹

Marta Júlia Faro ³

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

¹ Laboratório Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos
Avenida Brasil, 4.365, Pavilhão Leônidas Deane, CEP 21.040-360, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

² Pós-graduação em Malacologia de Vetores

³ Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios

* Autor para correspondência
waltervalente8@gmail.com

Submetido em 14/03/2022

Aceito para publicação em 08/08/2022

Resumo

Para manutenção do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* em laboratório, é necessário que moluscos hospedeiros intermediários sejam mantidos em condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Para a avaliação da biologia reprodutiva (fecundidade e fertilidade), do efeito dos nutrientes (alface e ração de peixe) e dos substratos (argila, mistura de sais e CaCO_3) e suas combinações, foram formados 10 grupos experimentais com 30 *Biomphalaria glabrata* cada: RC (Ração de peixe/ CaCO_3); LC (Alface/ CaCO_3); RA (Ração de peixe/Argila); LA (Alface/Argila); RS (Ração de peixe/Mistura de sais); LS (Alface/Mistura de sais); RCA (Ração de peixe/ CaCO_3 /Argila); LCA (Alface/ CaCO_3 /Argila); RSA (Ração de peixe/Mistura de Sais/Argila); LSA (Alface/Mistura de sais/Argila). Os efeitos sobre a fecundidade dos animais foram avaliados semanalmente através da contagem do número de massas ovíferas por molusco, do número de ovos por massa ovífera e da quantidade de ovos por molusco. A fertilidade foi avaliada através da taxa de eclosão dos ovos por molusco. Entre os grupos estudados, RCA e RA apresentaram maior produção de ovos e massa ovífera. A média da quantidade de ovos férteis dos grupos RCA, RSA e RA foi maior que dos grupos alimentados com alface. Pôde-se observar que a alimentação interfere na fecundidade, aumentando o número de ovos individual e por massa ovífera e o número de massa. Os moluscos alimentados com ração de peixe apresentaram maturidade sexual mais precoce em relação aos animais alimentados por alface.

Palavras-chave: Criação de molusco; Taxa de fecundidade e fertilidade

Abstract

Assessment of the reproductive biology of molluscs of the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) exposed to different types of food and substrates. To maintain the biological cycle of *Schistosoma mansoni* in the laboratory, it is necessary that the intermediate host snails are kept in favorable conditions for their development, in order to evaluate their reproductive biology (fecundity and fertility), the effect of diets (lettuce and fish feed), substrates (clay, mixture of salts, and CaCO_3), and their combinations. Ten experimental groups were formed, each one with 30 *Biomphalaria glabrata*: RC (Fish food/ CaCO_3); LC (Lettuce/ CaCO_3); RA (Fish food/Clay); LA (Lettuce/Clay); RS (Fish food/salt mixture); LS (Lettuce/Salt mixture); RCA (Fish food/ CaCO_3 /Clay); LCA (Lettuce/ CaCO_3 /Clay); RSA (Fish food/Salt mixture/Clay); LSA (Lettuce/Salt mixture/Clay). The effects on the fecundity of the snails were evaluated weekly by counting the number of ovigerous masses per mollusc, number of eggs per ovigerous mass, and number of eggs per mollusc. Fertility was evaluated using the hatching rate of eggs per mollusc. Among the groups studied, RCA and RA had higher egg production and higher egg masses. The average of fertile eggs for the RCA, RSA and RA groups was higher than for those fed with lettuce. It could be observed that feeding interferes with fecundity, increasing the number of eggs individually, and by ovigerous mass and the mass number. The molluscs fed on fish food showed earlier sexual maturity compared to animals fed on lettuce.

Key words: Molluscs farming; Fecundity and fertility rate

Introdução

O filo Mollusca é o segundo maior grupo zoológico, seus representantes estão em vários ambientes naturais e são fundamentais na manutenção dos ecossistemas de onde eles fazem parte (BARNES et al., 2005). Entre os representantes desse filo, na Classe Gastropoda e na família Planorbidae temos os moluscos do gênero *Biomphalaria*. Esses moluscos atuam como hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da doença infecciosa e parasitária conhecida como esquistossomose mansoni (RODRIGUES et al., 2020). O molusco *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) atua como principal hospedeiro intermediário de *S. mansoni* no Brasil e isso se deve, principalmente, à sua alta plasticidade ecológica, às altas taxas de infecção e à eficiência na transmissão do parasito (RIBEIRO et al., 2021).

Estima-se que mundialmente 200 milhões de pessoas estejam acometidas pela esquistossomose (WHO, 2022), sendo que nas Américas *S. mansoni* é a única espécie responsável pela doença. No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que 6 milhões de indivíduos podem estar infectados e outros 25 milhões com risco de contrair a doença (BRASIL, 2018).

Biomphalaria glabrata habita ambientes límnicos que apresentam condições ecológicas necessárias para

sua sobrevivência e é capaz de se reproduzir através da autofecundação (hermafroditas), porém, apresenta preferência pela fecundação cruzada (COSTA et al., 2004). Alguns fatores podem interferir na manutenção da criação e no desenvolvimento de *Biomphalaria* 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).

Normalmente, a oviposição ocorre durante o período da noite, e a massa de ovos ou desova é depositada sob 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 lentamente a partir do contato com a água, e em torno de 30 minutos apresenta a forma de um disco transparente, firme e flexível (PARAENSE, 1972). O ovo começa a se dividir cerca de 2 h após a postura e entre sete e dez dias pode ocorrer a eclosão (SOUZA, 2020).

A alimentação pode influenciar na fecundidade e na fertilidade dos moluscos. Segundo Chiff (1975), dietas ricas em proteínas conseguem promover tanto aumento de crescimento quanto da fertilidade no animal adulto. O cálcio é um elemento importante para vida

desses animais, além da formação das conchas (onde fica armazenado na forma de carbonato de cálcio), sua participação é essencial na contração muscular, no desenvolvimento embrionário, no crescimento, na resistência ao ataque de predadores e na resposta imunológica (MARTINS-SOUZA, 2006; MELLO-SILVA et al., 2006; TUNHOLI et al., 2011).

Portanto, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito dos nutrientes (alface e ração de peixe) e dos substratos (argila, mistura de sais e CaCO_3) na fecundidade e fertilidade dos moluscos *B. glabrata* criados em condições laboratoriais.

Material e Métodos

Desenho experimental

Exemplares de *B. glabrata* coletados no município de Sumidouro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (22°02'46"S e 42°41'42"W) que eram mantidos no laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios – Instituto Oswaldo Cruz, IOC-FIOCRUZ, Brasil, foram acondicionados em recipientes de polietileno (70 x 20 x 45 cm) contendo 4 L de água desclorada. Os animais foram alimentados com folhas frescas de alface (*Lactuca sativa*) higienizadas com água corrente desclorada. Dois cubos de isopor (60 x 30 x 5 mm) foram colocados na água dos recipientes para ovipostura (AUGUSTO et al., 2012). Neste experimento foram utilizadas desovas de *B. glabrata*, sendo que os moluscos da F1 foram separados e colocados em aquários para serem utilizados nos grupos. Cada grupo foi formado por 30 moluscos.

Administração dos nutrientes (alface e ração de peixe) e exposição aos substratos (argila e carbonato de cálcio – CaCO_3)

A argila utilizada como substrato foi obtida da localidade Maromba, MG (8 g), já o carbonato de cálcio utilizado (4 g) é de grau analítico Vitrocell® (VITROCELL Inc., Campinas, Brasil). A mistura de sais foi composta por: Cloreto de Cálcio – CaCl_2 (43,41 g),

Carbonato de Cálcio – CaCO_3 (83,3 g), Cloreto de Ferro – FeCl_3 (0,037 g), Carbonato de Magnésio – MgCO_3 (8,3 g), Sulfato de Magnésio – MgSO_4 (49,91 g), Cloreto de Potássio – KCl (1,6 g), Sulfato de Potássio – K_2SO_4 (3,33 g), Bicarbonato de Sódio – NaHCO_3 (32,83 g) e Cloreto de Sódio – NaCl (8,3 g) dissolvidos em 1 L de água destilada. A solução de mistura de sais foi adicionada à água dos aquários na proporção de 1 mL de solução de sais para cada litro de água do microambiente do aquário.

Dependendo do grupo experimental, os moluscos foram alimentados com alface *in natura* (0,2 g) ou ração de peixe Alcon® Basic (ALCON Inc., Camboriú, Brasil) (0,05 g), cuja composição é: 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) e Metionina (833,3 mg).

Os animais foram alimentados nos primeiros 48 dias com 0,05 g de ração de peixe ou 0,2 g de alface por aquário. A quantidade de alimento fornecido está relacionada com a maturidade dos moluscos. Após 70 dias, o quantitativo de ração de peixe foi ajustado para 0,1 g e no 84º dia foi reajustado para 0,2 g. Estes ajustes estão relacionados com a maturação sexual e ao crescimento dos moluscos. A alimentação foi fornecida duas vezes por semana, esses procedimentos fazem parte da rotina do moluscário.

TABELA 1: Mapa experimental para alimentação e uso do substrato para os 10 grupos experimentais.

Grupo Experimental	Alimentação	Substrato
RC (Ração de peixe e CaCO ₃)	Ração de Peixe: 0,05 g/0,1 g/0,2 g	CaCO ₃ 4 g
LC (Alface e CaCO ₃)	Alface 0,2 g	CaCO ₃ 4 g
RA (Ração de Peixe e Argila)	Ração de Peixe: 0,05 g/0,1 g/0,2 g	Argila 8 g
LA (Alface e Argila)	Alface 0,2 g	Argila 8 g
RS (Ração de peixe e Mistura de sais)	Ração de Peixe: 0,05 g/0,1 g/0,2 g	Mistura de sais 4 mL
LS (Alface e Mistura de sais)	Alface 0,2 g	Mistura de sais 4 mL
RCA (Ração de peixe/CaCO ₃ /Argila)	Ração de Peixe: 0,05 g/0,1 g/0,2 g	CaCO ₃ 4 g + Argila 8 g
LCA (Alface/CaCO ₃ /Argila) – Grupo Controle	Alface 0,2 g	CaCO ₃ 4 g + Argila 8 g
RSA (Ração de peixe/Mistura de sais/Argila)	Ração de Peixe: 0,05 g/0,1 g/0,2 g	Mistura de sais 4 mL + Argila 8 g
LSA (Alface/Mistura de sais/Argila)	Alface 0,2 g	Mistura de sais 4 mL + Argila 8 g

A quantidade de alimentos oferecida aos moluscos foi aumentada gradualmente, levando em conta a necessidade de cada grupo de animais, durante o período de desenvolvimento e mortalidade destes, até alcançar 0,2 g de ração de peixe. Esse procedimento teve como objetivo evitar o depósito ou acúmulo do alimento no fundo do aquário, situação que poderia favorecer o surgimento de microrganismos e prejudicar de maneira substancial o experimento. Para os grupos alimentados com alface *in natura*, esse procedimento não foi adotado, ou seja, o quantitativo foi o mesmo (0,2 g) para todas as fases de desenvolvimento dos caramujos.

Nos primeiros 48 dias, os animais foram alimentados com 0,05 g de ração de peixe. Após 70 dias, o quantitativo de ração de peixe foi ajustado para 0,1 g, e no 84º dia foi oferecido 0,2 g – quantidade que foi mantida até o final do crescimento. Os caramujos foram alimentados duas vezes por semana. Foi determinado que o grupo LCA (alface, carbonato e argila) seria o grupo controle, uma vez que essa é considerada a condição padrão (devido à utilização dessa alimentação e substrato) em diversos moluscários para fins de experimentação no Brasil e no exterior (PARAENSE; CORRÊA, 1973; FARO et al., 2013).

Avaliação dos parâmetros de fecundidade e fertilidade

As observações da fecundidade (número de massas ovígeras por molusco, número de ovos por massa ovígera e número 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 microscópio estereoscópico e um contador. Uma vez por semana, foram avaliados esses parâmetros incluindo a taxa de sobrevivência, e considerando aspectos visuais tais como tamanho do molusco e aspectos da água (coloração e turbidez).

Análise estatística

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 $p < 0,05$. Para análise estatística, foi utilizado o Programa PRISM versão 8.0.1 para Windows GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Resultados

Fecundidade

Foram observadas 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 62^o ao 119^o dia de experimento (período referente à maturidade sexual do molusco), conforme demonstrado nas Figuras 1, 2 e 3.

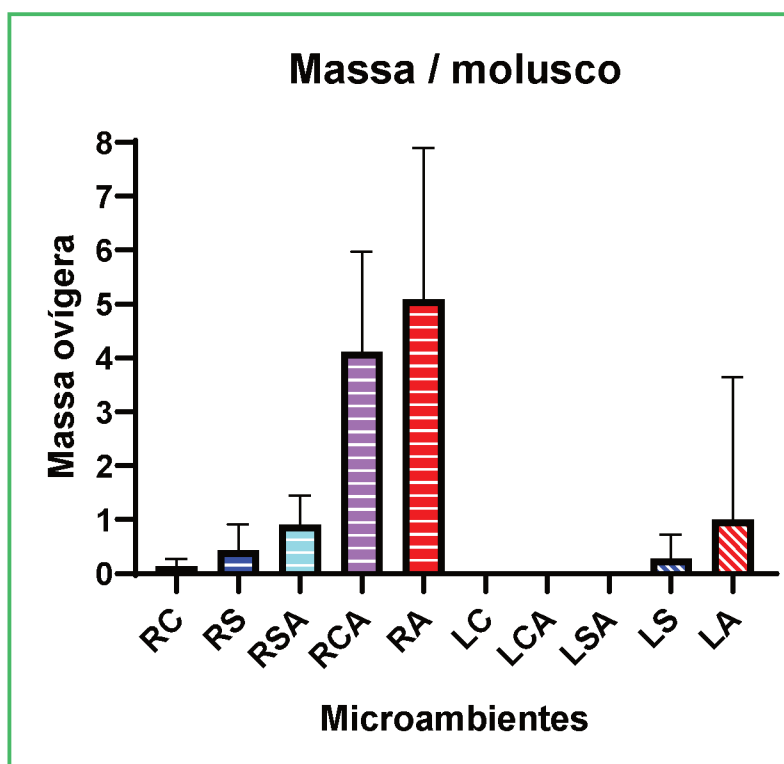
Como pode-se observar na Figura 1, os grupos RA e RCA e RSA demonstraram ovipostura maior que os demais grupos, com a média de 5,0, 4,1 e 0,9 massas ovíferas por molusco. No grupo controle (LCA) não houve postura no período de 119 dias. Como demonstrado no gráfico, pode-se perceber que o grupo LC não apresentou desenvolvimento devido ao óbito de todos os moluscos. Já no grupo LSA, os animais estavam

muito imaturos devido ao seu baixo desenvolvimento de tamanho e peso.

É possível observar que a relação média de massa ovígera por molusco ao longo de 119 dias é maior nos grupos RA, RCA e RSA. O grupo RA apresentou uma média de 5,09 massas ovíferas por molusco, resultando em uma significância estatística ($P = 0,0029$) em relação aos grupos LA, que apresentou uma média de 1 massa ovígera por caramujo ao longo desses 119 dias, e LS, que apresentou média de massa por molusco de 0,27 ($P = 0,0045$). O grupo LCA demonstrou $P < 0,0001$ devido ao não amadurecimento sexual e não oviposição no período de 119 dias (com a média de 0 massa por molusco). LSA apresentou $P < 0,0001$, pois não houve também o amadurecimento sexual por conta da mortalidade.

O grupo RCA também apresentou significância estatística em relação ao grupo LA, apresentando $P = 0,0040$, e ao grupo LS, que apresentou $P = 0,0061$.

FIGURA 1: Relação média de massa ovígera por molusco 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 entre os dias entre 62 e 119.



O grupo LCA apresentou $P < 0,0001$ devido ao não amadurecimento sexual e a não oviposição nesse período de 119 dias. O grupo LSA mostrou $P < 0,0001$, também por não haver amadurecimento sexual durante o período de experimento.

O Grupo RSA também apresentou significância estatística em relação aos grupos LCA ($P = 0,0225$) e LSA ($P = 0,0225$). Como observamos, os resultados desse grupo não foram significantes do ponto de vista estatístico em relação aos grupos LS e LA, que foram alimentados com alface.

Foi possível observar que, em geral, os grupos experimentais, principalmente os grupos RA e RCA, apresentaram significância estatística em relação aos grupos cuja alimentação foi feita com alface, o que demonstrou um prematuro amadurecimento sexual dos animais alimentados com ração de peixe.

Os grupos alimentados com ração de peixe: RC, RA, RCA, RSA apresentaram oviposição a partir do dia 62, com exceção do grupo RS, que ovipôs a partir do dia 69. Dos grupos alimentados por alface, LA só

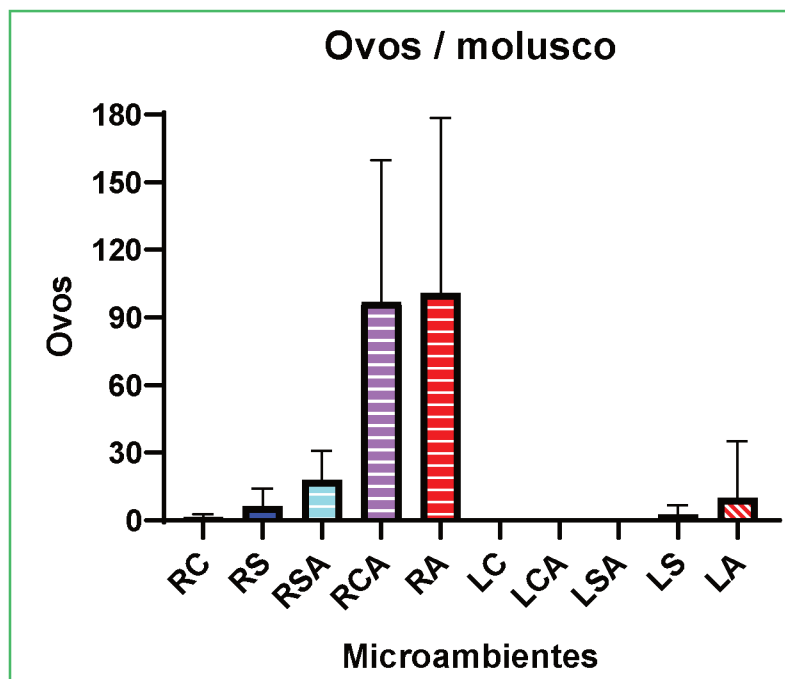
realizou oviposição a partir do dia 69 e LS a partir do dia 76. Os demais grupos, LCA e LSA, não realizaram postura durante todos os 119 dias devido ao provável não amadurecimento sexual durante o período. Já no grupo LC, não houve postura de ovos devido à morte de todos os indivíduos.

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

Quando se observa a relação média de ovos por moluscos, podemos constatar que houve uma relação semelhante com a média das massas ovígeras por molusco, conforme demonstrado nas Figuras 1 e 2.

Conforme observado na Figura 2, o grupo RA apresentou significância estatística em relação ao grupo LA ($P = 0,0038$), com média de postura de 100,75 ovos por molusco. O grupo LA apresentou média de 9,96 ovos por molusco no mesmo período de avaliação. Esse resultado pode estar relacionado ao tipo de alimentação e ao substrato utilizado. Também houve relevância

FIGURA 2: 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 e 119.



estatística em relação ao grupo LS ($P = 0,0058$), onde a média de ovos por molusco foi 2,55. Houve também relação estatística significativa entre os grupos LCA e LSA ($P < 0,0001$). Todavia, em ambos os grupos, isso ocorreu devido à imaturidade sexual durante o período de 119 dias que produziu uma média de 0 ovo por molusco.

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 ($P < 0,0001$) devido ao não amadurecimento sexual durante o período de experimento (Figura 2).

O grupo RSA, com a média de ovos por molusco de 17,90, apresentou ser significativo do ponto de vista estatístico em relação ao grupo LC ($P = 0,0090$), em função da mortalidade de todos os indivíduos, com o grupo LSA ($P = 0,0090$) e com o grupo LCA ($P = 0,0090$), devido à não ocorrência de oviposição desses dois últimos durante todo período do experimento.

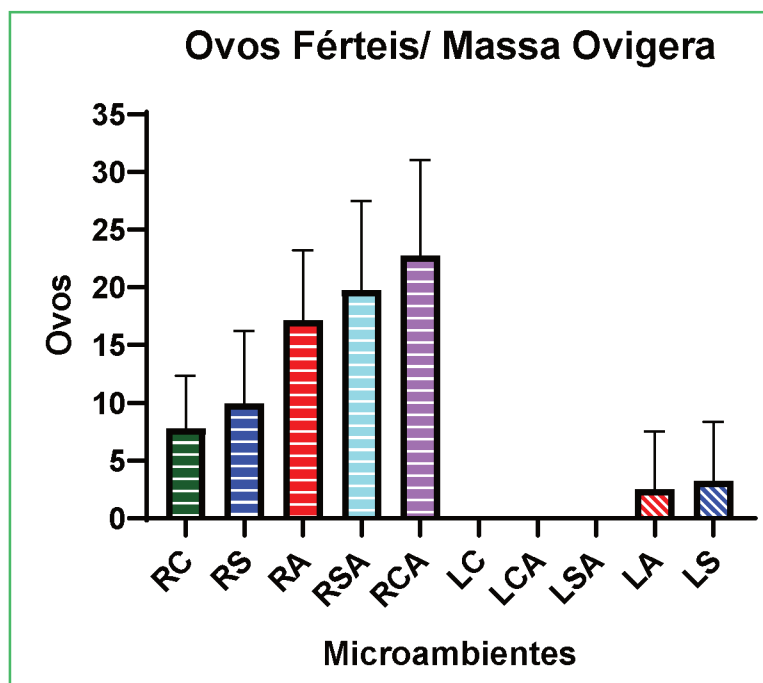
Mais uma vez constatamos que os grupos RA, RCA e RSA realizaram maior oviposição. Esses grupos foram alimentados com ração de peixe, se destacando aos demais grupos estudados.

Observamos também que nos grupos LSA e LCA não foi observada essa relação de ovos por molusco devido à não maturação sexual deles durante esse período de 119 dias. No grupo LA foi observado um aumento da oviposição no dia 119, indicando atraso da maturação sexual, quando comparado aos grupos alimentados com ração.

Os grupos RA, RCA e RSA apresentaram oviposição em todo período de observação durante o experimento (entre os dias 69 e 119), indicando prematura maturação sexual. O grupo LA, que também possui argila como substrato, no último dia de observação (dia 119), apresentou grande quantidade de ovos, totalizando 76 ovos. No entanto, o grupo LCA e LSA não apresentaram postura mesmo com a argila como substrato.

Na Figura 3, pode-se observar a relação de ovos por massa ovígera. Os grupos que apresentaram maior

FIGURA 3: Relação média de ovos por massa ovígera 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 entre os dias 62 e 119.



quantidade de ovos no interior de cada massa, ao longo desses 119 dias, foram RCA e RSA, seguido pelo RA.

No grupo RCA, houve oviposição média de 22,75 ovos por massa ovígera, sendo possível observar significância estatística quando comparado 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, cuja oviposição apresentou a média de 2,55 ovos por massa ovígera ($P = 0,0022$). Também foi observada significância estatística nos grupos LCA e LSA, que apresentaram $P < 0,0001$, devido à não oviposição desses grupos, uma vez 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 produziu uma média de 19,75 ovos por massa ovígera, obtendo significância estatística em relação ao grupo LA, que apresentou oviposição média de 2,55 ovos por massa ovígera ($P = 0,0093$). O grupo LS, também apresentou significância estatística com o valor $P = 0,0238$, em que 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 com indivíduos mortos e no qual não houve oviposição, ficando com a média de 0 ovo por massa ovígera. Os dados do grupo RA também foram estatisticamente significativos quando comparados aos de LA, que apresentou a média de 2,55 ovos por massa ovígera ($P = 0,0344$). O mesmo ocorreu com os grupos LCA e LSA, ambos com o valor $P = 0,0021$. É importante salientar que os grupos LCA e LSA, não alcançaram a maturidade sexual. O grupo RA apresentou a maior média de massa ovígera por molusco e média de ovos por molusco, no entanto, em relação à média de ovos por massa, ele ficou com um valor menor quando

comparado com as médias dos grupos RCA e RSA, mostrando massas ovígeras menores, com quantidades menores de ovos.

Conforme observado, esses grupos apresentaram quantidade maior de massa ovígera, com mais ovos em relação à 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.

A relação de ovos por massa ovígera é maior no 62º dia de experimento em todos os animais alimentados com ração de peixe, o que só ocorreu mais tardiamente (aos 69 dias) nos grupos LA e aos 76 dias no grupo LS, animais esses alimentados com a alface.

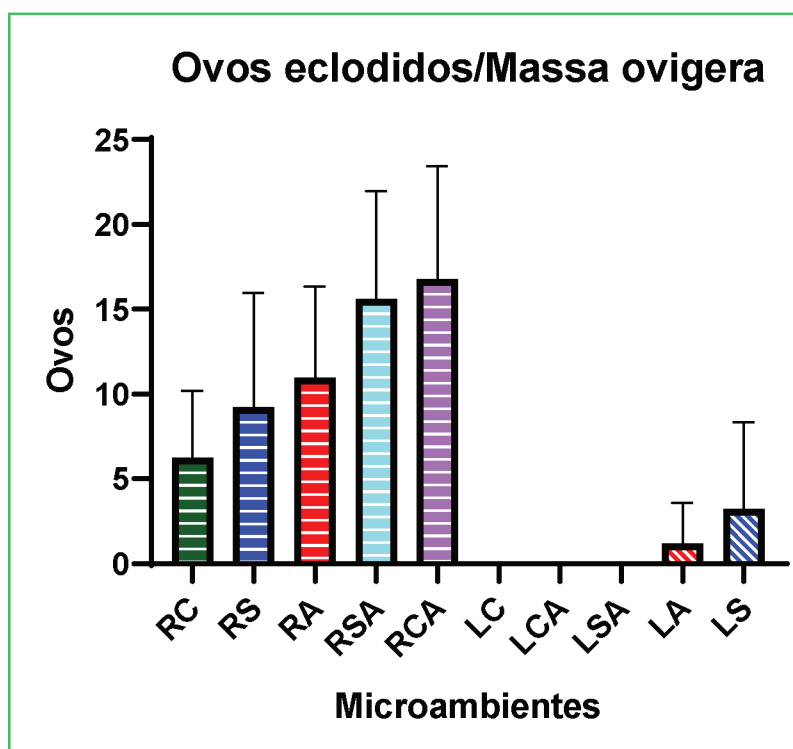
Os grupos LSA e LCA, que foram alimentados com alface, completaram os 119 dias sem realizar oviposição, aparentemente demonstrando um tardio desenvolvimento no amadurecimento sexual dos indivíduos dos referidos grupos. No dia 119, os grupos RCA, RSA e RA apresentaram uma relação superior a 25 ovos por massa ovígera, enquanto os grupos alimentados por 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 de 119 dias de avaliação. Já o grupo RC não apresentou significância estatística em relação aos outros grupos e ao grupo LC, que apresentou todos os indivíduos mortos desde o primeiro dia.

Fertilidade

Os grupos RCA, RSA e RA apresentaram a maior quantidade de ovos dentro de cada massa ovígera, ao longo dos 119 dias de experimento (Figura 4). O grupo RCA apresentou média de 16,75 ovos férteis por massa ovígera. Tal dado foi significativo do ponto de vista estatístico ($P < 0,0001$) em relação ao grupo LC, visto que todos os indivíduos deste grupo morreram e, conseqüentemente, não ocorreu a oviposição.

O grupo LS apresentou média de ovos férteis por massa ovígera de 3,22 ($P = 0,0192$) e LA apresentou significância estatística com a média de 1,19 ovo eclodido por massa ovígera, apresentando o valor $P = 0,0015$. Ocorreu significância estatística com os grupos LCA e

FIGURA 4: Relação média de ovos eclodidos por massa ovígera 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 entre os dias 62 e 119.



LSA ($P < 0,0001$) devido à não ocorrência de oviposição desses grupos, que não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de experimento, apresentando média de 0 ovo eclodido por massa ovígera.

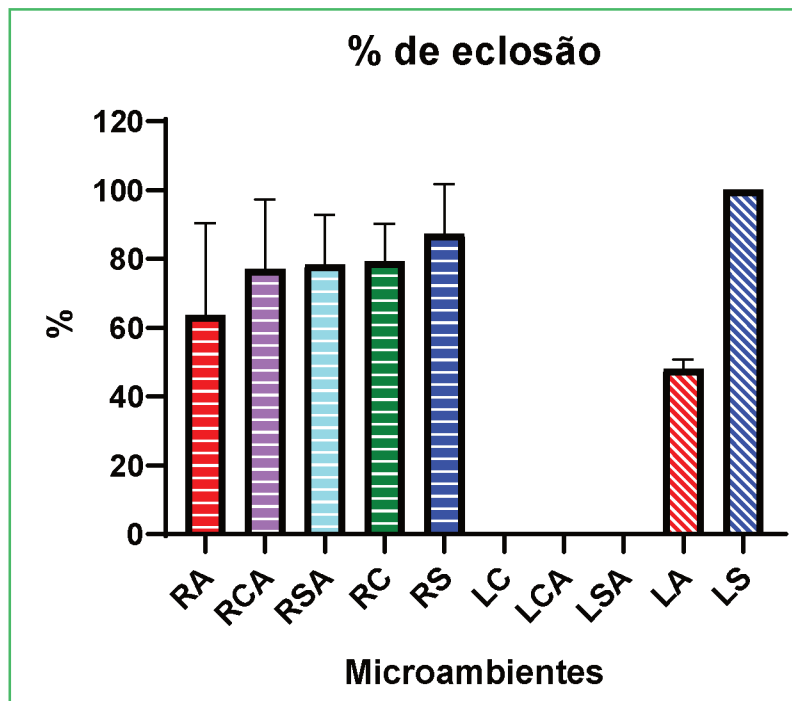
Foi observado também que o grupo RSA obteve considerável quantidade de ovos eclodidos por massa ovígera, uma média de 15,61 ovos. Foi possível observar significância estatística em relação ao grupo LC ($P = 0,0003$), devido à condição dos indivíduos mortos desse grupo, não ocorrendo a oviposição e ficando 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 ovo eclodido por massa ovígera ($P = 0,0028$). O grupo LS apresentou a média de ovos férteis por massa ovígera de 3,22 e apresentou significância estatística com o valor $P = 0,0333$. Os grupos LCA e LSA, que apresentaram $P = 0,0003$, não alcançaram a maturidade sexual durante os dias de desenvolvimento, ficando com a média 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 destacar 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 alfaca.

A porcentagem de eclosão foi calculada a partir do número de ovos férteis pelo número de ovos eclodidos, como podemos observar na Figura 5, e todos os animais alimentados com ração de peixe obtiveram média superior a 60%. O grupo RS obteve média de 87,23%, o grupo 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 apresentou média de 63,76%. Dos grupos alimentados por alfaca,

FIGURA 5: 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 e 119.



LS ficou com média de 100% e LA apresentou média de 48,07%. Durante todo o período de 119 dias, os grupos LCA e LSA não apresentaram oviposição, não sendo possível aferir a taxa de eclosão. Em relação ao grupo LC, não houve eclosão devido à morte de todos os indivíduos logo no início do experimento.

Em relação à significância estatística do percentual de eclosão, podemos observar que os resultados do grupo RCA foram significativos em relação aos grupos LC, LCA e LSA ($P = 0,0082$, $P = 0,0082$ e $P = 0,0082$, respectivamente). O grupo 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 de experimento. Dessa forma, não foi possível aferir a taxa de eclosão dos referidos grupos.

Os resultados de taxa de eclosão do grupo RSA apresentaram significância estatística quando comparados aos resultados dos grupos LC, LCA e LSA ($P = 0,0086$, $P = 0,0086$ e $P = 0,0086$, respectivamente).

O grupo RS foi significativo do ponto de vista estatístico em relação aos grupos LC, LCA e LSA

($P = 0,0014$, $P = 0,0014$ e $P = 0,0014$, respectivamente). O mesmo ocorreu com o grupo RC quando comparado a esses mesmos grupos ($P = 0,0200$, $P = 0,0200$ e $P = 0,0200$, respectivamente). Os resultados dos animais do grupo LS também foram significativos quando comparados aos grupos LC, LCA e LSA ($P = 0,0022$, $P = 0,0022$ e $P = 0,0022$).

Comparando-se os resultados dos grupos RSA, RCA, RS, RA e RC – com diferentes substratos, submetidos à mesma alimentação (ração de peixe) – não houve diferenças estatisticamente significativas no percentual de eclosão entre os grupos quando comparados entre si. Todavia, a comparação dos percentuais de eclosão dos grupos com diferentes substratos alimentados por alface não foi considerada, visto que, ao final do experimento, só havia dois grupos viáveis (LA e LS). Os outros grupos não realizaram a oviposição (LCA e LSA) ou morreram no início do experimento (LC).

Discussão

Os estoques de energia são usados principalmente para manter as funções vitais, e o excesso é direcionado para o crescimento dos moluscos. 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).

Os grupos 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, os referidos grupos alimentados com ração de peixe apresentaram relação ovo/massa ovígera 2,5 vezes maior que esses grupos alimentados com alface.

Não só a alimentação pode ser um fator de interferência na fecundidade. Augusto et al. (2012) constataram que grupos com menor densidade populacional produziram mais ovos por molusco (como é o caso do grupo RCA, RA e LA no último dia de experimento, que apresentaram o quantitativo: 4, 7 e 1, respectivamente). Ocorreu diferença significativa em relação aos ovos colocados por caramujos nos grupos com menor densidade populacional, diferindo significativamente dos grupos com maior densidade populacional. A relação entre densidade populacional e número de ovos por massa pode indicar uma possível competição intraespecífica por alimento e substrato, influenciando negativamente na reprodução dos moluscos (OLIVEIRA et al., 2008; 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, e, com o aumento da densidade, ocorrem consequências negativas na dinâmica da população e na manutenção. O tempo da maturidade sexual também foi retardado com a diminuição da temperatura e com o aumento da densidade populacional de caramujos, mostrando

que interferências multifatoriais influenciam no desenvolvimento dos animais (AUFDERHEIDE et al., 2005). Mangal et al. (2010) sugeriram que os efeitos observados em *B. glabrata* mantidos em altas densidades podem ser decorrentes da competição por recursos alimentares, da depleção de oxigênio e/ou cálcio e da produção de produtos inibidores do crescimento ou de produtos tóxicos dispersos na água.

Segundo Silva et al. (2017), o cálcio também é um fator limitante para *B. glabrata*. Esse micromineral tem influência direta no crescimento da concha, fecundidade, oviposição, sobrevivência e manutenção do metabolismo interno. O cálcio está localizado principalmente na concha e na glândula digestiva (WILBUR; TOMPA, 1979; SILVA et al., 2017).

Tanto o crescimento como a taxa de postura são influenciados pela concentração do cálcio que os moluscos absorvem através 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, manto e concha, nesta última sob a forma de cálcio sólido. Esse íon atua em diversos sítios, participando na regulação eletroquímica do molusco e contribuindo 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 (BRASIL, 2008). Em nosso trabalho foi possível notar que o grupo RA foi o grupo que apresentou o maior número de ovos/moluscos entre os grupos cujo substrato não continha carbonato de cálcio. Além disso, o grupo RA é o terceiro grupo, entre os estudados, que apresentou maior relação de número de ovos férteis/molusco. Os grupos RCA e RSA, expostos ao carbonato de cálcio no substrato, apresentaram maiores correlações de ovos férteis por animal.

O cálcio influencia diretamente a 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 (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). 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 interfere na taxa de capacidade 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 (FOSTER et al., 1999). A dieta adequada é, portanto, um parâmetro-chave para o sucesso da criação de caramujos (SELCK et al., 2006).

Observou-se que o grupo RA (que não possui carbonato de cálcio como substrato) produziu maiores quantidades 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 alimentados por ração de peixe produziram maior número de ovos por molusco, ovos por massa ovígera e ovos férteis por moluscos quando comparados aos animais alimentados com alface. É provável que os grupos RCA, RSA e RA tenham obtido esses resultados devido ao maior peso e tamanho dos animais, visto que tais variáveis podem influenciar na quantidade de ovos e no tamanho da massa ovígera. No entanto, em relação à fertilidade, o tamanho e o peso aparentemente não influenciam diretamente na eclosão.

No entanto, os resultados mostraram que os grupos alimentados com ração apresentaram maturação sexual precoce e maior oviposição – conforme ocorreu nos grupos RA e RCA (gerando 100 e 97 ovos por moluscos). Enquanto o grupo LA (grupo com maior oviposição entre os alimentados por alface) gerou, em média, nove ovos.

Segundo Estoy et al. (2002), a maturidade sexual parece ser alcançada mais rapidamente alimentando os moluscos juvenis, de maneira contínua, com alface em abundância e como única fonte de alimento. O cálculo do tempo até a maturidade morfológica pressupõe ser determinado pelo tamanho e não pela idade em 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 e 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 (ESTOY et al., 2002).

Segundo Chiff (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.

Chiff (1975) demonstra em seu trabalho que dietas ricas em proteínas em planorbídeos conseguiram promover maior crescimento e aumento da fecundidade, demonstrando valores superiores aos alimentados com alface.

Segundo Chiff (1975), espécimes recém eclodidas e alimentadas com ração de peixe obtiveram menor índice de mortalidade (cerca de 35%), maior índice de crescimento e consequentemente atingindo maturidade sexual de maneira mais rápida. Todavia, em indivíduos alimentados com alface foi observado menores índices de oviposição. Nossos resultados demonstraram que caramujos alimentados com ração de peixe apresentaram menor mortalidade e maior índice de crescimento. Esses grupos alimentados com ração de peixe também

atingiram a maturidade sexual mais rapidamente e assim obtiveram maior oviposição, corroborando Chiff (1975).

Após a obtenção dos dados de nosso experimento, é possível concluir que os animais alimentados com ração de peixe apresentaram maturidade sexual mais precoce (apresentando maior quantidade de ovos por caramujo, massa ovígera e relação de ovos/massa ovígera). Tal aumento poderia ser justificado pelo rápido ganho de peso, que poderia ter ocasionado maturação sexual prematura e consequente aumento na fecundidade.

Caramujos mantidos em ambientes cujo substrato foi argila apresentaram índices reprodutivos melhores quando comparados aos animais de grupos mantidos exclusivamente em carbonato de cálcio ou mistura de sais.

O peso e o tamanho dos caramujos parecem não interferir na quantidade de ovos férteis, sendo a alimentação a variável mais importante que influenciaria esse parâmetro.

Dessa forma, a composição dos nutrientes interfere no desenvolvimento dos caramujos 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 é mais vantajosa já que os animais se desenvolvem mais rapidamente. E, em relação ao substrato, os animais criados com substrato argila apresentaram melhor desenvolvimento quando comparados aos demais grupos estudados, o que otimiza o tempo da criação e os recursos, gerando diminuição de custos.

Referências

- 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. **Invertebrate Biology**, Ohio, v. 125, p. 9-20, 2005.
- AUGUSTO, R. de C.; MAGALHÃES, A. C. da S.; MELLO-SILVA, C. C. A influência da densidade populacional e a ingestão de alimentos na biologia reprodutiva da *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) e da quantidade de cálcio em caramujos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 83-92, 2012.
- BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E.; FOX, R. S. **Zoologia de Invertebrados**. 7 ed. São Paulo: Roca, 2005. 1.146 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria em Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**: programa de vigilância e controle da esquistossomose. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 175 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Educação em Saúde para o Controle da Esquistossomose**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 42 p.
- 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: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Ed.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 393-418.
- CHIFF, P. P. Influência do tipo de alimentação sobre o crescimento, maturação sexual, sobrevivência e oviposição de *Biomphalaria glabrata* (Molusca, Planorbidae). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 91-99, 1975.
- COSTA, M. J. F. S.; GRAULT, C. E.; CONFALONIERI, U. E. C. Comparative study of the fecundity and fertility of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in a laboratory through self-fertilization and cross-fertilization. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 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 and Tissue Research**, Berlin, v. 236, p. 643-649, 1984.
- 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*. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, Amsterdam, v. 83, p. 217-227, 1980.
- 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). **Applied Entomology and Zoology**, Nakazato, v. 37, p. 543-550, 2002.
- EVELAND, L. K.; RITCHIE, L. S. Infectivity of cercariae of *Schistosoma mansoni* from snails on inadequate diets. **Parasitology**, London, v. 64, p. 441-444, 1963.
- FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; SOUZA, S.; ANDRADE, Z.; MALDONADO J. R. A. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 134, p. 228-234, 2013.
- FLORKIN, M.; SCHEER, B. T. **Chemical Zoology**. Vol. II. New York: Academic Press, 1972. 562 p.
- FOSTER, G. G.; HODGSON, A. N.; BALARIN, M. Effect of diet on growth rate and reproductive fitness of *Turbo sarmaticus*

- (Mollusca: Vegigastropoda: Turbinidae). **Marine Biology**, Kiel, v. 134, p. 307-315, 1999.
- LANDE, R.; ENGEN, S.; SAETHER, B. E. Estimating density dependence in time-series of age-structured populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 357, p. 1179-1184, 2002.
- 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**, Goiânia, v. 40, n. 1, p. 46-55, 2011.
- MANGAL, T. D.; PATERSON, S.; FENTON, A. Effects of snail density on growth, reproduction and survival of *Biomphalaria alexandrina* exposed to *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology Research**, London, 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***. 2006. 166 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.
- 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 latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N. E. B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 3-8, 2006.
- OLIVEIRA, C. S. A. de; VASCONCELLOS, M. C. B.; PINHEIRO, J. A. The population density effects on the reproductive biology of the snail *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 367-371, 2008.
- PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, W (Ed.). **Introdução à geografia médica do Brasil**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1972. p. 213- 239.
- PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 15, p. 127-130, 1973.
- 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)**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 3, p. 37-40, 2008.
- RIBEIRO, E. C. G.; LEITE, J. A. C.; LUZ, T. R. S. A.; SILVEIRA, D. P. B.; BEZERRA, S. A.; FRAZÃO, G. C. C. G.; PEREIRA, L. P. A. P.; SANTOS, E. G. G.; RIBEIRO-FILHO, P. R. C. F.; SOARES, A. M. S.; SANTOS, R. L.; COUTINHO, D. F. Molluscicidal activity of monoterpenes and their effects on inhibition of acetylcholinesterase activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 223, p. 106089, 2021.
- RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L. L.; VIEGAS-MELO, D.; TELES-REIS, A.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 62, n. e55, p. 1-6, 2020.
- SELCK, H.; 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). **Invertebrate Biology**, Ohio, v. 125, p. 106-116, 2006.
- SILVA, L. D.; AMARAL, V. C. S.; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M.; REZENDE, H. H. A.; SANTOS, D. B.; MELLO-SILVA, C. C.; BEZERRA, J. C. B. Changes in energetic metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) in response to exogenous calcium. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 77, n. 2, 2017.
- SOUZA, N. S. **Efeitos de nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO) sobre a reprodução de *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (Gastropoda: Pulmonata): um estudo multigeracional**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado e, Biodiversidade e Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2020.
- 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). **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 43, p. 839-860, 1974.
- 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 *Schinostoma paraensei* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 106, p. 192-195, 2011.
- WILBUR, K.; TOMPA, A. S. Physiological changes in gastropods during egg shell calcification. **Malacologia**, Washington, v. 18, p. 561-562, 1979.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Genebra. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis#:~:text=Schistosomiasis%20is%20an%20acute%20and%20chronic%20parasitic%20disease%20caused%20by,will%20reduce%20and%20prevent%20morbidity>. Acesso em: 14 jun. 2022.