

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos (PPGCTRA)

**Efeito do Cálcio no Desenvolvimento do Gastrópode *Pomacea dolioides*
(Reeve, 1856)**

RAFAELA FERNANDA BATISTA FERREIRA

Itacoatiara

2020

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos (PPGCTRA)

RAFAELA FERNANDA BATISTA FERREIRA

**Efeito do Cálcio no Desenvolvimento do Gastrópode *Pomacea dolioides*
(Reeve, 1856)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna

Itacoatiara

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383c Ferreira, Rafaela Fernanda Batista
Efeito do cálcio no desenvolvimento do gastrópode *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856) / Rafaela Fernanda Batista Ferreira . 2020
76 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Bruno Sampaio Sant'Anna
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Pomacea*. 2. Amazonas. 3. Cálcio. 4. Desenvolvimento. 5. Regeneração. I. Sant'Anna, Bruno Sampaio. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Rafaela Fernanda Batista Ferreira

Efeito do Cálcio no Desenvolvimento do Gastrópode
Pomacea dolioides (Reeve, 1856).

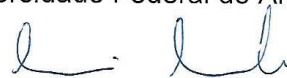
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado(a) em 10 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna (PPGCTRA) (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dr. Rafael Yutaka Kuradomi (ICET)
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dr. Lourí Klemann Júnior (PPGCTRA)
Universidade Federal do Amazonas

“Dedico este trabalho a meu esposo Fábio pela compreensão nos momentos de ausência e ajuda com as crianças. Aos meus filhos Luiza e Heitor fonte de inspiração e razão de minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças, sabedoria, discernimento e saúde para dar mais um passo importante em minha vida, pois, sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais Luiz e Sônia, meu irmão Sandro, minha avó Maurilda (*in memoriam*) e toda a minha família, por acreditarem no meu sonho, pelo apoio, incentivo e por confiar sempre nas minhas escolhas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna, pela oportunidade, aprendizado, amizade, compreensão diante das dificuldades e confiança depositada durante o desenvolvimento do presente estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas/FAPEAM pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Cnpq pelo auxílio financeiro concedido ao projeto de pesquisa Universal (Proc.409910/2016-3).

Ao Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori pela colaboração e sugestões dadas nos experimentos e na versão prévia dessa dissertação.

À pesquisadora Prof^a. Dr^a. Silvana Carvalho Thiengo do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, pelo auxílio na confirmação da identificação dos espécimes.

Ao Prof. Dr. Fernando José Zara disponibilizou o laboratório de histologia e microscopia eletrônica da UNESP, permitindo o aprofundamento das análises morfológicas. À Cláudia Fiorillo, pelas imagens da microestrutura das conchas.

A Prof^a. Dr^a. Fabiana Maria Monteiro Paschoal que disponibilizou equipamentos para as análises químicas.

A Prof^a. Dr^a Margarida Carmo de Souza pela ajuda com os cálculos de química.

A todos os colegas do laboratório Aldeiza, Diana, Emerson, Jovana, Lohane, Naira, Nelcilene e Pedro pela amizade, ajuda nas coletas, ajuda com os caramujos e experimentos, pela troca de informações e conhecimento durante o período do mestrado e nos momentos de descontração;

Aos colegas da pós-graduação do ICET, Bia, Elisa, João, Jussara, Monique, Raimundo e Vanessa pela amizade e oportunidade de aprender com a pesquisa de cada um e convivência durante as disciplinas.

Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia/UFAM, representada pelo corpo de docentes, técnicos e funcionários;

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela licença de coleta concedida para execução dos experimentos.

“As criaturas que habitam esta terra em que vivemos, sejam elas seres humanos ou animais, estão aqui para contribuir, cada um com sua maneira peculiar para a beleza e a prosperidade do mundo”.

Dalai Lama

RESUMO

A região amazônica é conhecida por ter grande biodiversidade aquática e a mais importante bacia tropical do planeta. Ao longo do Rio Amazonas e da maioria de seus afluentes, a elevada precipitação anual resulta em extensas áreas inundadas, denominadas de várzeas. Neste contexto, os caracóis do gênero *Pomacea* constituem uma parte importante da fauna nativa de água doce. Buscando compreender a relação do cálcio em moluscos da Amazônia, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cálcio no desenvolvimento e regeneração das conchas do gastrópode *Pomacea dolioides*. Inicialmente foi feito um levantamento dos gastrópodes no município de Itacoatiara-AM, onde foram coletados, identificados e analisados quanto a ocorrência de danos nas conchas. Também coletamos amostras de água para determinação do cálcio no ambiente. Posteriormente, gastrópodes foram distribuídos em seis tratamentos com diferentes concentrações de Ca^{2+} , este experimento teve duração de 60 dias, onde verificamos o crescimento, engorda, concentração de cálcio no animal inteiro e a microestrutura da concha. Além disso, analisamos o processo de regeneração das conchas submetidas a diferentes concentrações de cálcio, com dois tipos de corte (triângulo e retângulo) e duas induções. Os resultados demonstraram que não houve relação dos danos na concha com a concentração de cálcio no ambiente. Experimentalmente, o cálcio dissolvido na água foi essencial para o gastrópode *P. dolioides*, visto que, na ausência de cálcio os gastrópodes não sobreviveram por mais de 40 dias. Estes apresentaram melhor desenvolvimento a partir das concentrações de 60, 80 e 100 mg/L de sulfato de cálcio testadas. O tempo de regeneração das conchas não diferiu entre os tratamentos com diferentes concentrações de cálcio. Os gastrópodes apresentaram capacidade de regenerar as áreas danificadas com diferentes tipos de incisões e induções num tempo relativamente baixo com alta taxa de sobrevivência. A partir desses resultados, concluímos que a presença de danos nas conchas no ambiente pode estar relacionada a outros fatores e não somente à concentração de cálcio e que existe uma relação entre o cálcio dissolvido na água e o desenvolvimento do gastrópode *P. dolioides* em relação ao comprimento, peso inorgânico e orgânico e o cálcio da concha e do caracol inteiro. Em virtude disso, é importante considerar o ambiente externo no processo de aquisição de íons Ca^{2+} e não apenas o cálcio absorvido via alimentação.

Palavras-chave: *Pomacea*, Amazonas, Cálcio, Desenvolvimento, Regeneração

ABSTRACT

The Amazon region is known for having great aquatic biodiversity and the most important tropical basin on the planet. Along the Amazon River and most of its tributaries, the high annual rainfall results in extensive flooded areas, called floodplains. In this context, snails of the genus *Pomacea* constitute an important part of the native freshwater fauna. Seeking to understand the relationship of calcium in mollusks in the Amazon, the objective of this work was to evaluate the effect of different concentrations of calcium on the development and regeneration of the shells of the gastropod *Pomacea dolioides*. Initially, a survey of gastropods was made in the municipality of Itacoatiara-AM, where they were collected, identified and analyzed for the occurrence of damage to the shells. We also collect water samples to determine calcium in the environment. Subsequently, gastropods were distributed in six treatments with different concentrations of Ca^{2+} , this experiment lasted 60 days, where we verified the growth, fattening, calcium concentration in the whole animal and the microstructure of the shell. In addition, we analyzed the regeneration process of shells subjected to different concentrations of calcium, with two types of cut (triangle and rectangle) and two inductions. The results showed that there was no relationship between shell damage and calcium concentration in the environment. Experimentally, calcium dissolved in water was essential for the gastropod *P. dolioides*, since, in the absence of calcium, the gastropods did not survive for more than 40 days. These showed better development from the concentrations of 60, 80 and 100 mg / L of calcium sulfate tested. The regeneration time of the shells did not differ between treatments with different concentrations of calcium. Gastropods showed the ability to regenerate damaged areas with different types of incisions and inductions in a relatively short time with a high survival rate. From these results, we conclude that the presence of damage to the shells in the environment may be related to other factors and not only to the concentration of calcium and that there is a relationship between calcium dissolved in water and the development of gastropod *P. dolioides* in relation to length, inorganic and organic weight and calcium from the shell and the whole snail. As a result, it is important to consider the external environment in the process of acquiring Ca^{2+} ions and not just the calcium absorbed via food.

Keywords: *Pomacea*, Amazonas, Calcium, Development, Regeneration

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II	25
Figura 1. Figura 1- Localização geográfica dos locais de amostragem no Município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A: Amazônia, B: Itacoatiara, C: locais de amostragem. 1: Bairro da Paz, 2: Bairro Mamud Amed, 3: Centenário, 4: Jacarezinho (- - - Rodovia AM 010) e 5: Lago do Canaçari.....	30
Figura 2. Ilustração do corte realizado nas conchas dos gastrópodes <i>P. dolioides</i> para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: área de crescimento da concha, B: área calcificada.....	36
Figura 3. Relação entre a proporção de danos nas conchas (%) e a concentração de cálcio (mg/L) nos locais amostrados	37
Figura 4. Superfície da concha de <i>P. dolioides</i> coletadas no ambiente. As setas indicam os danos (furos) nas conchas.....	38
Figura 5. Proporção de danos nas conchas ao longo do tempo em <i>P. dolioides</i> mantidas em diferentes concentrações e cálcio na água.....	38
Figura 6. Parâmetros de desenvolvimento de <i>P. dolioides</i> submetidos a cinco concentrações de cálcio durante 60 dias. TCE= taxa de crescimento específico (A); GB= ganho de biomassa (B); GPA= ganho de peso absoluto (C); GPP= ganho de peso em porcentagem (D).....	39
Figura 7. Relação entre o tempo de experimento (dias) e o comprimento da concha (mm) de <i>P. dolioides</i> em diferentes concentrações de cálcio, (T= tratamento)	40
Figura 8. Relação entre o tempo de experimento (dias) e o ganho de peso (g) de <i>P. dolioides</i> submetidos a diferentes concentrações de cálcio, (T= tratamento)	41
Figura 9. Porcentagem de cálcio nos gastrópodes submetidos a diferentes concentrações de sulfato de cálcio.....	42
Figura 10. Caracterização estrutural da concha de <i>Pomacea dolioides</i> (A a E). Perióstraco (p), protuberâncias perióstracais triangulares (pt), estrutura nacarada (en), estrutura lamelar cruzada (elc).....	43
Figura 11. Espessura das conchas de <i>Pomacea dolioides</i> submetidas a diferentes concentrações de sulfato de cálcio.....	44

Figura 12. Caracterização estrutural da concha de *Pomacea dolioides* (A a E). A= 20, B=40, C= 60, D= 80 e E= 100 mg/L de sulfato de cálcio. Estrutura nacarada (en), estrutura lamelar cruzada (elc). Barra de escala= 10µm.....45

Capítulo III..... 56

Figura 1- Localização geográfica dos locais de amostragem no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A: Amazônia, B: Itacoatiara, C: locais de amostragem. (●) Mamud Amed- coleta dos gastrópodes, (▲) – Lago da Poranga coleta de água. 61

Figura 2. Imagens da regeneração da concha de *Pomacea dolioides* ao longo do experimento (10 dias) após a primeira (A) e segunda (B) incisões em forma de triângulo. Barra de escala= 0,5 cm.....63

Figura 3. Imagens da regeneração da concha de *Pomacea dolioides* ao longo do experimento (10 dias) após a primeira (A) e segunda (B) incisões em forma de retângulo. Barra de escala= 0,5 cm.....64

Figura 4. Taxa de sobrevivência dos gastrópodes *Pomacea dolioides* com relação as concentrações de CaSO₄, tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções.....66

Figura 5. Taxa de sobrevivência dos gastrópodes *Pomacea dolioides* com relação ao tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey após a análise fatorial.....67

Figura 6. Tempo de regeneração dos gastrópodes *Pomacea dolioides* com relação as concentrações de sulfato de cálcio, tipo de corte e indução.....67

Figura 7. Tempo de regeneração dos gastrópodes *Pomacea dolioides* com água do ambiente em relação ao tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey após a análise fatorial.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão para os parâmetros de qualidade da água durante 60 dias de experimento com *P. dolioides* em diferentes concentrações de sulfato de cálcio.....33

Tabela 2. Valores do peso da concha, das cinzas e da massa de carbonato de cálcio das conchas de *P. dolioides* calcinadas por 48 horas e digeridas por 6 horas.....42

SUMÁRIO

Capítulo 1	14
1. Introdução Geral.....	15
1. Caracóis de maçã e sua importância	15
2. Características da bacia amazônica	16
3. Papel do cálcio nos moluscos	17
2. Referências Bibliográficas	19
Capítulo 2.....	25
Efeito do cálcio no desenvolvimento do gastrópode <i>Pomacea dolioides</i> (Reeve, 1856)	25
Resumo	26
Abstract	27
1. Introdução	28
2. Material e Métodos.....	30
2.1 Ocorrência de danos nas conchas de <i>P. dolioides</i> no ambiente.....	30
2.1.1 Análise dos dados	31
2.2 Experimento 1 – Efeito da concentração de cálcio no desenvolvimento de <i>P. dolioides</i>	32
2.2.1 Análise dos dados	33
2.2.2 Determinação da concentração de cálcio nos gastrópodes	34
2.2.3 Análise dos dados	35
2.2.4 Caracterização da microestrutura das conchas de <i>Pomacea dolioides</i>	35
2.2.5 Análise dos dados	36
3. Resultados	37
4. Discussão.....	46
5. Conclusão	50
6. Referências Bibliográficas.....	51
Capítulo 3.....	56
A Concentração de Cálcio na Água Interfere na Regeneração das Conchas de <i>Pomacea dolioides</i> (Reeve, 1856)?	56
Resumo	57
Abstract	58
1. Introdução	59
2. Material e Métodos.....	61

2.1 Efeito da concentração de cálcio na regeneração das conchas de <i>P. dolioides</i>	61
2.1.1 Análise dos dados	65
3. Resultados	66
4. Discussão.....	69
5. Conclusão	71
6. Referências Bibliográficas	72

Capítulo 1

Introdução Geral



INTRODUÇÃO GERAL

1. Caracóis maçã e sua importância

Os representantes da família Ampullariidae se distribuem naturalmente nos trópicos e subtropicais úmidos na África, América e Ásia (Berthold 1991; Cowie 2002; Cowie et al. 2017), habitando as margens de rios, córregos, lagos, pântanos e ambientes lênticos (Horgan et al. 2014). Nestes ambientes, estes gastrópodes geralmente constituem uma parte importante da fauna nativa de água doce (Hayes et al. 2015) compondo mais de 20% da biodiversidade (Strong et al. 2008). Entre os nove gêneros geralmente reconhecidos (Hayes et al. 2015), os indivíduos do gênero *Pomacea* são comumente denominados como caracóis maçã por causa de suas conchas grandes e redondas (Cowie et al. 2017). Atualmente são descritas cerca de 50 espécies deste gênero (Cowie et al. 2017), das quais 38 foram registradas para a região Amazônica (Thiengo et al. 2017).

O gênero *Pomacea* ficou conhecido devido as invasões bem sucedidas em diversas partes do mundo (Horgan et al. 2014; Hayes et al. 2015), através da introdução de várias espécies como animais de estimação ou alimentos, onde se estabeleceram e se tornaram grandes pragas agrícolas e ambientais (Cowie 2002; Rawlings et al. 2007; Hayes et al. 2012; Hayes et al. 2015). Esses animais são usados como fonte de proteína para seres humanos (Cagauan & Joshi, 2003) ou para elaboração de ração para animais (Barboza & Romanelli 2004). Além de servirem como presas importantes para peixes, répteis, aves, entre outros animais (Thiengo et al. 2017). Também são utilizados como agente biológico no controle de plantas daninhas (Okuma et al. 1994a; Kenji, 2003) e indicadores de poluição por cádmio, chumbo, cobre, tributilestanho, zinco (Vega et al. 2012; Al-Maliki et al. 2015; Ramirez-Prado et al. 2016; Martinez et al. 2017; Peña 2017) entre outros contaminantes. Além disso, são utilizados na medicina tradicional (Alves & Alves, 2011) e para obtenção de produtos e substâncias (Abdullah et al. 2017) como o óxido de cálcio para a produção de biodiesel (Margaretha et al. 2012, Ki et al. 2017), quitina e quitosana (Kaewboonruang et al. 2016, Trisnaningrum et al. 2016).

O sucesso da sua distribuição ocorreu graças as características do gênero, como alimentação de origem animal e vegetal (Strong et al. 2008), elevada fecundidade e reprodução durante boa parte do ano (Burlakova et al. 2010),

crescimento rápido (Estebenet & Martin, 2002) e resistência a diferentes temperaturas da água (Seuffert & Martín 2013) e a dessecação (Wada & Matsukura, 2011; Yoshida et al. 2014). Devido à sua importância ecológica, como espécies invasoras, indicadores de poluição ou como fonte de alimentos (Barboza & Romanelli 2004; Barboza et al. 2006; Glass & Darby 2009), o interesse por fatores que afetam a distribuição e a abundância desses moluscos é crescente (Glass & Darby 2009, Bernatis et al. 2016, Pierre et al. 2017). Além disso, informações sobre a biologia desses gastrópodes no seu habitat natural são escassas (Watanabe et al. 2015; Bernatis et al. 2016), especialmente para as espécies Amazônicas como *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856) (Melo et al. 2017), que não são invasoras como *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822).

2. Características da bacia amazônica

A região amazônica é conhecida por ter grande biodiversidade aquática (Agostinho et al. 2005), e por ser a maior e mais importante bacia tropical do planeta (Neill et al. 2006). Ao longo do rio Amazonas e da maioria de seus afluentes, a alta precipitação anual leva a grandes oscilações na vazão dos rios resultando em extensas áreas inundadas sazonalmente (Junk et al. 2011), conhecidas como áreas de várzea. Utilizando a cor da água e parâmetros físico-químicos, Sioli (1956) descreveu as características limnológicas dos grandes rios amazônicos, classificando-os em rios de água branca, preta e clara. Assim, o Rio Amazonas foi caracterizado como um rio de água branca e está entre os 10 maiores do mundo (Latrubesse 2008).

Os rios de água branca transportam sedimentos ricos em nutrientes que são depositados em extensas planícies de inundação (áreas de várzeas), com diversidade de plantas e animais (Junk et al. 1989; Junk et al. 2011). Suas águas têm pH quase neutro e concentrações relativamente altas de sólidos dissolvidos (Junk et al. 2011), principalmente Ca^{2+} e HCO_3^- , o que as classificam como carbonatadas (Gaillardet et al. 1997). Queiroz et al. (2009) ao estudarem a hidroquímica do rio Solimões, verificaram que dentre os cátions presentes nas águas brancas, o cálcio e o sódio representaram 64% da carga total com predominância do Ca^{2+} . Souto et al. (2015), também observaram concentrações de cálcio no rio Solimões-Amazonas em torno 11,41 mg/L e na região do Novo Remanso no rio Amazonas de 3,35 a 9,55 mg/L. Além disso, esses mesmos autores perceberam que durante os meses de maio a

setembro houve um aumento nas concentrações dos íons devido ao período de águas baixas, quando os ambientes de várzeas ficam isolados dos rios.

3. Papel do cálcio nos moluscos

O cálcio é essencial no ciclo de vida dos moluscos, pois promove a formação da concha, funciona como solução tampão em processos metabólicos e participa da produção de células de defesa, além de influenciar na sua capacidade fagocítica (Magalhães et al. 2011). Estudos sobre o papel do cálcio no desenvolvimento de gastrópodes são crescentes, bem como sua importância no metabolismo dos moluscos. Neste sentido, experimentos em laboratório testaram os efeitos de diferentes concentrações de cálcio em diferentes espécies de gastrópodes (Thomas et al. 1974; Madsen 1987; Brodersen & Madsen 2003), concluindo que, em geral, as espécies são capazes de sobreviver em ambientes com baixas concentrações de cálcio. No entanto, o crescimento é inibido e as conchas se tornam mais finas. Dalesman et al. (2011), observaram o efeito da concentração de cálcio no ambiente na formação de memória, fisiologia e no comportamento de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) em resposta ao treinamento para reduzir a respiração aérea. A mobilização do cálcio da concha para a hemolinfa em *Biomplalaria glabrata* (Say, 1818) exposto a diferentes soluções de CaCO_3 foi observado por Magalhães et al. (2011), os quais concluíram que ocorre mobilização frequente de cálcio de acordo com a quantidade de cálcio disponível no ambiente. Silva et al. (2017), concluíram que as exposições ao CaCO_3 influenciaram na redução de glicose e alteraram as vias do metabolismo energético em *B. glabrata*.

Apesar de estudos sobre *P. dolioides* ter sido desenvolvidos no Amazonas, não há estudos sobre os efeitos da concentração de cálcio no desenvolvimento da espécie. Como o registro de imposex em *P. dolioides* e *P. diffusa* Blume, 1957 (Fonseca et al. 2017), estudos sobre cultivo e frequência alimentar, onde Píres-Junior et al. (2019) determinaram o melhor alimento e frequência alimentar. Além de trabalhos sobre reprodução que determinaram a fecundidade e relação positiva com o tamanho das fêmeas, tempo de desenvolvimento embrionário que ocorre em média em 10 dias (Melo et al. 2017), e comparações morfológicas dos testículos e espermatozoides entre *P. dolioides* e *P. diffusa* (Paschoal & Oliveira 2017). Pelo exposto acima, fica claro que estudos sobre o desenvolvimento do gastrópode *P.*

dolioides, que levem em consideração a concentração de cálcio dissolvida na água são necessários para a compreensão da biologia e ecologia dos caracóis de água doce, além de poderem auxiliar em futuro cultivo da espécie na região Amazônica.

Referências Bibliográficas

- ABDULLAH. A.; NURJANA. H; REYHAN. M. Karakterisasi dan identifikasi senyawa aktif ekstrak pigmen telur keong mas. **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, v. 20, n. 2, p. 286-295, 2017.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 646-652. 2005.
- AL-MALIKI, G. M.; AL-KHAFAJI, K. K.; AL-SHEMARY, A. J. Study of the bacterial pollution and some heavy metals in freshwater snail (*Pomacea canaliculata*) in Shatt Al-Arab river. **Journal of Basrah Researches (Sciences)**, v. 41, n. 3, 2015.
- ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. 2011. The faunal drugstore: animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, n. 1, p. 9, 2011.
- BARBOZA, S. H. R.; ROMANELLI, P.F. Estudo do aproveitamento das vísceras dos moluscos escargot (*Achatina fulica*) e aruá (*Pomacea lineata*) para incorporação em ração animal. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 245-250, 2004.
- BARBOZA, S. H. R.; COSTA, D. P. S. da.; ROMANELLI, P. F. Processamento e avaliação sensorial da carne dos moluscos escargot (*Achatina fulica*) e aruá (*Pomacea lineata*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 413-418, 2006.
- BERNATIS, J. L.; MCGAW, I. J.; CROSS, C. L. Abiotic Tolerances in Different Life Stages of Apple Snails *Pomacea canaliculata* and *Pomacea maculata* and the Implications for Distribution. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, n. 4, p. 1013-1025, 2016.
- BERTHOLD, T. Vergleichende anatomie, phylogenie und historische biogeographieder Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda). **Hamburg: Parey**, v. 29, p. 1-256, 1991.
- BURLAKOVA, L. E.; PADILLA, D. K.; KARATAYEV, A. Y.; HOLLAS, D. N.; CARTWRIGHT, L. D. E.; NICHOL, K. D. Differences in population dynamics and potential impacts of a freshwater invader driven by temporal habitat stability. **Biol Invasions**, v. 12, p. 927-941, 2010.

BRODERSEN, J.; MADSEN, H. The effect of calcium concentration on the crushing resistance, weight and size of *Biomphalaria sudanica* (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia**, v. 490, p. 181-186, 2003.

CAGAUAN, A. G.; JOSHI, R. C. Golden apple snail *Pomacea* spp. In the Philippines: review on levels of infestation, control methods, utilization and future research directions. **Journal of Agriculture and Life Sciences**, v. 37, n. 2, p. 7-32, 2003.

COWIE, R. H. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. In: G. M. BARKER. (Ed). **Molluscs as Crop Pests**. CABI, Wallingford, 2002. p. 145-192.

COWIE, R.; HAYES, K. A.; STRONG, E. E.; THIENGO, S. C. Non-native apple snails: systematics, distribution, invasion history and reasons for introduction. In: Joshi, R.C., Cowie, R.H., Sebastian, L.S. (Ed). **Biology and Management of Invasive Apple Snails**. Maligaya: Philippine Rice Research Institute, 2017. p. 3-32.

DALESMAN, S.; BRAUN, M. H.; LUKOWIAK, K. Low environmental calcium blocks long-term memory formation in a freshwater pulmonate snail. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, p. 393-403, 2011.

ESTEBENET, A. L.; MARTÍN, P. R. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. **Biocell**, v. 26, n. 1, p. 83-89, 2002.

FONSECA, A. M.; HATTORI, G. Y.; COSTA, M. B. da.; SANT'ANNA, B. S. Imposex in two apple snails of the Amazon. In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazon Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 47-65.

GAILLARDET, J.; DUPRÉ, B.; ALLÈGRE, C. J.; NÉGREL, P. Chemical and physical denudation in the Amazon River Basin. **Chemical Geology**, v. 142, p. 141-173, 1997.

GLASS, N.H.; DARBY, P.C. The effect of calcium and pH on Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae), shell growth and crush weight **Aquatic Ecology**, v. 43, p. 1085-1093, 2009.

HAYES, K. A.; COWIE, R. H.; THIENGO, S. C.; STRONG, E. E. Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 166, p. 723-753, 2012.

HAYES, K. A.; BURKS, R. L.; CASTRO-VAZQUEZ, A.; DARBY, P.C.; HERAS, H.; MARTIN, P. R.; QUI, JIAN-WEN.; THIENGO, S. C.; VEIGA, I. A.; WADA, T.; YUSA, Y.; BURELA, S.; CARDIENO, M. P.; CUETO, J. A.; DELLAGNOLA, F. A.; DREON, M. S.; FRASSA, M. V.; GIRAUD-BILLOUD, M.; GODOY, M. S.; ITUARTE, S.; KOCH, E.; MATSUKURA, K.; PASQUEVICH, M.Y.; RODRIGUEZ, C.; SAVEANU, L.; SEUFFERT, M. E.; STRONG, E. E.; SUN, J.; TAMBURI, N. E.; TIECHER, M. J.; TURNER, R. L.; VALENTINE-DARBY, P. L.; COWIE, R. H. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 58, n. 1–2, p. 245-302, 2015.

HORGAN, F. G.; STUART, A. M.; KUDAVIDANAGE, E. P. Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. **Acta Oecologica**, v. 54, p. 90-100, 2014^a.

JUNK, W. J. **Flood tolerance and tree distribution in central Amazonian floodplains**. In: Holm-Nielsen LB, Nielsen IC, Balslev H (eds) Tropical forests: botanical dynamics, speciation and diversity. Academic, London, p. 47–64, 1989.

JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; SCHÖNGART, J.; COHN-HAFT, M.; ADENEY, J. M.; WITTMANN, F. A. Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. **Wetlands**, v. 31, p. 623–640, 2011.

KAEWBOONRUANG, S.; PHATRABUDDHA, N.; SAWANGWONG, P.; PITAKSANURAT, S. Comparative studies on the extraction of chitin–chitosan from golden apple snail shells at the control field. **IOSR Journal of Polymer and Textile Engineering**, v. 3, p. 34-41, 2016.

KENJI, I. Expansion of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*, and features of its habitat. **Food and fertilizer technology center**, p.1-10, 2003.

KI, O. L.; ISMADJI, S.; AYUCITRA, A.; SOETAREDJO, F. E.; MARGARETHA, Y. Y.; PRASETYA, H. S. Use of apple snail (*Pomacea sp.*) shell as a catalyst for biodiesel production: full factorial design optimization. In: JOSHI, R. C.; COWIE, R. H.; SEBASTIAN, L. S (Eds.). **Biology and management of invasive apple snails**. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Maligaya, Science City of Munoz, Nueva Ecija 3119. 2017. 406 pp.

LATRUBESSE, E. M. Patterns of anabranching channels: The ultimate end-member adjustment of mega rivers. **Geomorphology**, v. 101, p. 130–145, 2008.

MADSEN, H. Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (gastropoda: planorbidae). **Journal of Applied Ecology**, v. 24, p. 823-836, 1987.

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.

MARGARETHA, Y. Y.; PRASTYO, H. S.; AYUCITRA, A.; ISMADJI, S. Calcium oxide from *Pomacea* sp. shell as a catalyst for biodiesel production. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 3, n. 1, p. 33, 2012, 2012.

MARTINEZ, M. L.; PIOL, M. N.; NUDELMAN, N. S.; GUERRERO, N. R. V. Tributyltin bioaccumulation and toxic effects in freshwater gastropods *Pomacea canaliculata* after a chronic exposure: field and laboratory studies. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 5, p. 691-701, 2017.

MELO, I. B.; HOTTORI, G. Y.; SANT'ANNA, B. S. Reproduction and substrate selection for oviposition of the gastropod *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856). In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazon Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 89-107.

NEILL, C.; ELSENBEER, H.; KRUSCHE, A. V.; LEHMANN, J.; MARKEWITZ, D.; FIGUEIREDO, R. de. O. Hydrological and biogeochemical processes in a changing Amazon: results from small watershed studies and the large-scale biosphere atmosphere experimente. **Hydrological Processes**, v. 20, p. 2467–2476, 2006.

OKUMA, M.; TANAKA, K.; SUDO, S. Weed control method using apple snail (*Pomacea canaliculata*) in paddy fields. **Weed Research**, v. 39, n. 2, p. 114-119, 1994a.

PASCHOAL, L. R. P.; OLIVEIRA, L. J. F. de. Histology and Histochemistry of the testes in two Amazonian apple snails. In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazon Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 127-144.

PENA, S. C. Accumulation of copper and other elements by the apple snail *Pomacea canaliculata*. In: JOSHI R. C.; COWIE R. H.; SEBASTIAN L. S. (Eds.). **Biology and management of invasive apple snails**. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Maligaya, Science City of Munoz, Nueva Ecija 3119. 2017. p. 406.

PIERRE, S. M.; QUINTANA-ASCENCIO, P. F.; BOUGHTON, E. H.; JENKINS, D. G. Dispersal and local environment affect the spread of an invasive apple snail (*Pomacea maculata*) in Florida, USA. **Biological Invasions**, v. 19, p. 2647–2661, 2017. doi:10.1007/s10530-017-1474-5

PIRES-JÚNIOR, A. N.; HATTORI, G. Y.; SANT'ANNA, B. S. Effect of stock density of cultured Amazon Apple Snail *Pomacea dolioides* (Gastropoda: Ampullariidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, p. 1-8, 2019.

QUEIROZ, M. M. A.; HORBE, A. M. C.; SEYLER, P.; MOURA, C. A. V. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 943 – 952, 2009.

RAMIREZ-PRADO, N.; PERNIA, B.; MERO, M.; LARRETA, E.; NOBOACARDENAS, A.; RAMIRES-MOREIRA, L.; LOPEZ, L.; ZAMBRANO, J.; MUNOZ, J.; BRAVO K.; BAQUERIZO, M.; BENAVIDES A.; CASTRO, R. *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1828) como bioindicador de la presencia de cadmio en el rio Guayas, Daule y Babahoyo. **Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales**, v. 10, p. 19-28, 2016.

RAWLINGS, T. A.; HAYES, K. A.; COWIE, R. H.; COLLINS, T. M. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the Continental United States. **BMC Evolutionary Biology**, 7: 97, 2007. doi:10.1186/1471-2148-7-97

SEUFFERT, M. E.; MARTÍN, P. R. Distribution of the apple snail *Pomacea canaliculata* in Pampean streams (Argentina) at different spatial scales. **Limnologia-Ecology and Management of Inland Waters**, v. 43, n. 2, p. 91-99, 2013.

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 Biological**, v. 77, n. 2, p. 304-311, 2017.

SIOLI, H. Über Natur und Mensch im brasilianischen Amazonasgebiet. **Erdkunde**, v. 10, n. 2, p. 89–109, 1956.

SOUTO, L. F. L.; OLIVEIRA, T. C. de. S.; SILVA, M. do. S. R. da. Variação espacial de cátions, ânions e variáveis físico-químicas no rio Solimões-Amazonas entre Manaus e Jutáí, bacia amazônica. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 4, p. 415 – 424, 2015.

STRONG, E. E.; GARGOMINY, O.; PONDER, W. F.; BOUCHET, P. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 149-166, 2008.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; PIMPAO, D. M. Diversity of Amazon Ampullariidae (Mollusca; Caenogastropoda). In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazon Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 1-20.

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). British Ecological Society. **Journal of Animal Ecology**, v. 43, n. 3, p. 839-860, 1974.

TRISNANINGRUM, Y. F.; WAHYUNI, S.; ROFIEQ, A. Penggunaan chitosan cangkang keong mas (*Pomacea canaliculata*) untuk bahan pengawet alami dalam mempertahankan mutu buah selama proses penyimpanan sebagai media audio visual pembelajaran bioteknologi. **Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia**, v. 2, n. 3, p. 237-247, 2016.

VEGA, I. A.; ARRIBERE, M. A.; ALMONACID, A. V.; GUEVARA, S. R.; CASTRO-VAZQUEZ, A. Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3307-3316, 2012.

WADA, T.; MATSUKURA, K. Linkage of cold hardiness with desiccation tolerance in the invasive freshwater apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 77, n. 2, p. 149-153, 2011.

WATANABE, T. T.; HATTORI, G. Y.; SANT'ANNA, B. S. Activity, substrate selection, and effect of a simulated Amazon flood regime on the behaviour of the apple snail, *Pomacea bridgesii*. **Marine and Freshwater Research**.

YOSHIDA, K.; MATSUKURA, K.; CAZZANIGA, N. J.; WADA, T. Tolerance to low temperature and desiccation in two invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae), collected in their original distribution area (northern and central Argentina). **Journal of Molluscan Studies**, v. 80, n. 1, p. 62-66, 2014.

CAPÍTULO II

Efeito do Cálcio no Desenvolvimento do Gastrópode *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856)



RESUMO

O cálcio é essencial na vida dos moluscos, pois está relacionado com a formação da concha, participa dos processos metabólicos e adaptação desses animais no meio ambiente. Buscando compreender a relação do cálcio em moluscos da Amazônia, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da concentração de cálcio na proporção de danos na concha e no desenvolvimento do gastrópode *Pomacea dolioides*. Foram mapeados cinco pontos de coleta no Município de Itacoatiara-AM, nos quais gastrópodes foram coletados, identificados e verificados quanto a ocorrência de danos nas conchas. Amostras de água também foram coletadas para análise da concentração de cálcio. Para verificar o efeito da concentração de cálcio no desenvolvimento dos gastrópodes, 540 juvenis de tamanho similar foram distribuídos em seis tratamentos com diferentes concentrações de Ca^{2+} (0, 20, 40, 60, 80 e 100mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) por 60 dias, a alimentação foi padronizada para todos os tratamentos. Para determinação da concentração de cálcio no gastrópode inteiro e nas conchas foram utilizados quatro gastrópodes de cada réplica. Estas foram secas, calcinadas e o cálcio das conchas determinado por titulação. Para caracterização estrutural, três conchas do ambiente e de cada tratamento foram examinadas com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura. A proporção de gastrópodes com danos nas conchas diferiu significativamente entre locais amostrados, sendo maior no Jacarezinho, Bairro Mamud Amed e Bairro da Paz e menor no Lago do Canaçari e Centenário. A concentração de cálcio variou significativamente entre os ambientes, com maior concentração no lago do Canaçari e menor no Jacarezinho. Não houve correlação entre a proporção de danos e a concentração de cálcio nas áreas investigadas, assim como não há diferença entre a proporção de danos e o sexo dos gastrópodes. A proporção de danos nas conchas no laboratório apresentou diferença significativa entre os tratamentos com aumento de lesões ao longo do tempo. A taxa de mortalidade foi significativamente menor no tratamento com maior concentração de cálcio (100 mgL^{-1}). Além disso, os tratamentos com maiores concentrações de sulfato de cálcio (60, 80 e 100 mgL^{-1}) apresentaram ganhos significativamente maiores para a taxa de crescimento específico, biomassa, ganho de peso absoluto e ganho de peso em porcentagem. O mesmo padrão foi observado para o crescimento e ganho de peso em relação aos dias de cultivo. Assim como a espessura da concha, que foi maior nas três últimas concentrações de sulfato de cálcio com duas camadas de cristais. O teor de cálcio nos gastrópodes e de carbonato de cálcio nas conchas foi significativamente maior no tratamento com 80 mg/L de sulfato de cálcio. Além disso, o cálcio dissolvido na água foi essencial para o gastrópode *P. dolioides*, visto que, na ausência de cálcio os gastrópodes não sobreviveram por mais de 40 dias, apresentando maior crescimento e engorda partir de 60 mgL^{-1} de CaSO_4 .

Palavras-chave: Crescimento, Concha, Cálcio, *Pomacea dolioides*

ABSTRACT

Calcium is essential in the life of mollusks, as it is related to the formation of the shell, participates in the metabolic processes and adaptation of these animals in the environment. Seeking to understand the relationship of calcium in mollusks in the Amazon, the objectives of this work were to evaluate the effect of calcium concentration on the proportion of damage in the shell and on the development of the gastropod *Pomacea dolioides*. Five collection points were mapped in the Municipality of Itacoatiara-AM, in which gastropods were collected, identified and checked for damage to the shells. Water samples were also collected for analysis of calcium concentration. To verify the effect of calcium concentration on gastropod development, 540 juveniles of similar size were distributed in six treatments with different concentrations of Ca^{2+} (0, 20, 40, 60, 80 and 100mg / L of $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) for 60 days, the food was standardized for all treatments. To determine the calcium concentration in the entire gastropod and in the shells, four gastropods from each replica were used. These were dried, calcined and the calcium in the shells determined by titration. For structural characterization, three shells from the environment and from each treatment were examined with the aid of a scanning electron microscope. The proportion of gastropods with shell damage differed significantly between sampled locations, being higher in Jacarezinho, Bairro Mamud Amed and Bairro da Paz and lower in Lago do Canaçari and Centenário. The calcium concentration varied significantly between environments, with higher concentration in the lake of Canaçari and lower in Jacarezinho. There was no correlation between the proportion of damage and the concentration of calcium in the areas investigated, just as there is no difference between the proportion of damage and the sex of gastropods. The proportion of damage to the shells in the laboratory showed a significant difference between treatments with increased lesions over time. The mortality rate was significantly lower in the treatment with higher calcium concentration (100 mgL⁻¹). In addition, treatments with higher concentrations of calcium sulfate (60, 80 and 100 mgL⁻¹) showed significantly greater gains for the specific growth rate, biomass, absolute weight gain and weight gain in percentage. The same pattern was observed for growth and weight gain in relation to the days of cultivation. As well as the shell thickness, which was higher in the last three concentrations of calcium sulfate with two layers of crystals. The calcium content in gastropods and calcium carbonate in the shells was significantly higher when treated with 80 mg / L of calcium sulfate. In addition, calcium dissolved in water was essential for gastropod *P. dolioides*, since, in the absence of calcium, gastropods did not survive for more than 40 days, showing greater growth and fattening from 60 mgL⁻¹ of CaSO_4 .

Keywords: Growth, Shell, Calcium, *Pomacea dolioides*

1.INTRODUÇÃO

O cálcio tem sido descrito como um dos fatores limitantes que influencia as populações de gastrópodes de água doce (Thomas et al. 1974; Watson & Ormerod 2004; Glass & Darby 2009). Os íons de cálcio desempenham papel importante na biologia dos moluscos e estão relacionados à distribuição, sobrevivência e adaptação dos gastrópodes adultos no meio ambiente. O cálcio é importante para a formação da concha, crescimento, oviposição e resistência ao ataque de predadores, explicando por que esses gastrópodes procuram ambientes ricos em cálcio para o seu estabelecimento e desenvolvimento (Thomas et al. 1974; Nduku & Harrison 1976; Dawies & Erasmus 1984; Tunholi et al. 2011). Nesse sentido, Martin et al. (2001) descreveram a ocorrência de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1804) em águas contendo em média 29,8 mg/L de cálcio em comparação com áreas não habitadas com 14,8 mg/L. Glass & Darby (2009), registraram massas de ovos de *Pomacea paludosa* (Say, 1829) em ambientes contendo uma variação de cálcio entre 5,7 mg/L e 78 mg/L.

As conchas dos moluscos são compostas por cristais de carbonato de cálcio incrementados ao longo da vida do animal por um processo de cristalização que depende de fatores intrínsecos e ambientais (Paula & Silveira, 2009). Assim, cristais de aragonita e calcita são organizados em camadas formando a estrutura da concha juntamente com o nácar (Paula & Silveira, 2009; Paula et al. 2010; Dauphin et al. 2014). Esta estrutura é coberta externamente com perióstio não calcificado (Paula & Silveira, 2009). Análises de microscopia de varredura revelaram protuberâncias perióstracais dispostas em espiral na concha de *P. canaliculata* (Estebenet et al. 2006) e estudos desenvolvidos por Meenaksh et al. (1975) demonstraram o componente mineral da concha de *P. paludosa* como aragonita. A *Pomacea lineata* (Spix, 1827) apresentou um biomaterial constituído basicamente por CaCO_3 com predominância de aragonita e estruturas de nácar colunar e lamelar cruzado (Paula & Silveira, 2009; Paula et al. 2010).

Estudos sobre a influência do cálcio proveniente de fontes exógenas são crescentes. Ewald et al. (2009), relataram a importância do cálcio no ambiente para melhorar os impactos da acidificação. Ebanks et al. (2010), caracterizaram o mecanismo de aquisição de Ca^{2+} , HCO_3^- , CO_3^{2-} necessários para o processo de

calcificação da concha de embriões. Em ambientes onde as concentrações de cálcio são menores que 20 mg/L os moluscos tem respiração cutânea aumentada e diminuição na motilidade (Dalesman et al. 2011). Concentrações menores que 50 mg/L fazem as células gastarem muita energia para captar cálcio do ambiente e com 80 mg/L estes custos energéticos são reduzidos (Greenaway, 1971). Bukowski & Auld (2014), verificaram que o efeito predador versus espessura da concha em *Physa acuta* Draparnaud, 1805 aumentou com a disponibilidade de cálcio, desenvolvendo conchas mais pesadas e mais grossas. Para gastrópodes do gênero *Pomacea* a porcentagem de cálcio, tamanho e peso de esmagamento afetadas por diferentes concentrações de cálcio em *P. paludosa* foram investigadas por Glass & Darby (2009).

Ainda que se tenha desenvolvido estudos sobre a *P. dolioides* (Fonseca et al. 2017, Melo et al. 2017, Paschoal & Oliveira 2017, Píres-Junior et al. 2019), o conhecimento sobre os Ampullariidae da Amazônia é escasso, apesar da riqueza de espécies e seu uso pelas populações ribeirinhas, seja para alimentação, saúde ou para o artesanato regional (Thiengo et al. 2017). Testando a hipótese de que a concentração de cálcio influencia no desenvolvimento de *P. dolioides*, o presente estudo avaliou a relação entre a concentração de cálcio dissolvida na água e a proporção de danos nas conchas, crescimento, ganho de peso, concentração de cálcio no gastrópode e nas conchas e as características da microestrutura das conchas.

2. Material e Métodos

2.1- Ocorrência de danos nas conchas de *P. dolioides* no ambiente

O estudo foi realizado no município de Itacoatiara, Estado do Amazonas, localizado na Amazônia Central. A estação chuvosa geralmente ocorre de janeiro a maio, com as maiores precipitações de dezembro a maio (Bittencourt e Amadio, 2007; Ruiz e Alencar, 2004), inundando grandes áreas planas da planície de inundação amazônica denominadas de várzea e igapó (Junk 2000).

Para verificar a ocorrência de danos nas conchas de *P. dolioides* no ambiente, os gastrópodes foram amostrados em áreas alagadas dos Bairros da Paz, Mamud Amed, Centenário, Jacarezinho e no Lago do Canaçari (Figura 1) entre os meses de maio a agosto de 2018 no período de cheia (Bittencourt e Amadio, 2007). Estes foram coletados manualmente e com auxílio de puçás. Em seguida os gastrópodes foram colocados cuidadosamente em caixas plásticas com água e aeração, e transportados até o laboratório.

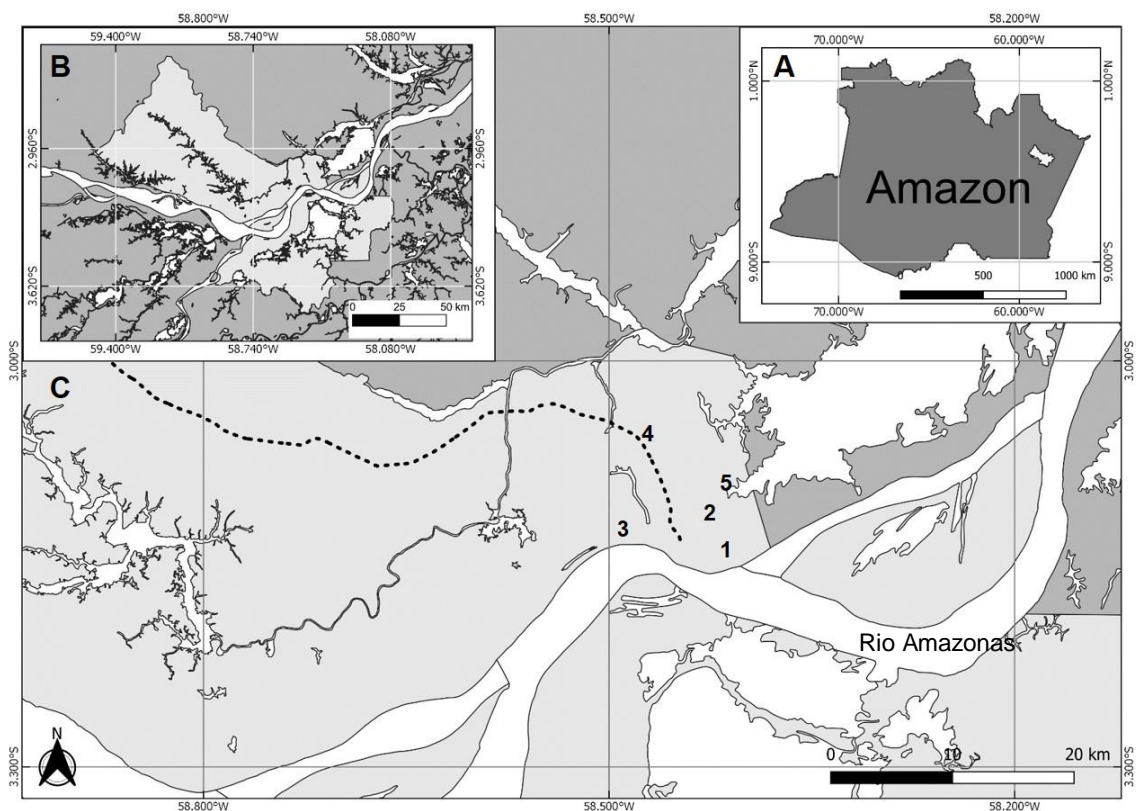


Figura 1- Localização geográfica dos locais de amostragem no Município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A: Amazônia, B: Itacoatiara, C: locais de amostragem. 1: Bairro da Paz, 2: Bairro Mamud Amed, 3: Centenário, 4: Jacarezinho (- - - Rodovia AM 010) e 5: Lago do Canaçari.

No laboratório os gastrópodes foram anestesiados com solução de cloreto de magnésio 10% por uma hora (Zeidan et al. 2018). Após este procedimento os caramujos foram identificados de acordo com a morfologia da concha e anatomia interna (Simone, 2006), determinados quanto ao sexo e pesados em balança (0,01g). Também foram medidos quanto ao comprimento da concha com auxílio de paquímetro (0,05 mm). Os danos na concha foram caracterizados como furos localizados principalmente no ápice da concha e registrados visualmente. A confirmação da identificação dos espécimes e tombamento dos exemplares foi realizada pela especialista em moluscos Prof^a. Dr^a. Silvana Carvalho Thiengo do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Os gastrópodes foram tombados (# 11433, 11434, 11435 e 11436) e depositados na Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz. O presente estudo foi desenvolvido sob autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio # 7158399/63335) vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

Em cada local onde os gastrópodes foram coletados o pH foi medido com medidor de pH (Asko AK90) e amostras de água que foram armazenadas em garrafas previamente enxaguadas com solução de ácido nítrico e congeladas para posterior determinação da concentração de cálcio (mg/L) em triplicada, segundo o método titrimétrico EDTA do “Standard Methods” (Baird et al. 2017). Foram transferidos 50 mL da amostra filtrada e homogeneizada para um erlenmeyer de 250 mL e adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N até pH entre 12 e 13 e 0,1g de indicador murexida. Esta solução foi titulada com solução padrão de EDTA-Na 0,01 mol.L⁻¹. O volume de EDTA gasto na titulação foi registrado e o cálcio foi calculado pela equação: $Ca (mg)L = A \times B \times 400,8/mL$ da amostra, onde A= mL da titulação para a amostra, B= mg CaCO₃ equivalente a 1 mL da solução padrão de EDTA-Na 0,01 mol.L⁻¹

2.1.1 Análise dos dados

A relação entre a concentração de cálcio nos ambientes amostrados e a proporção de gastrópodes com danos nas conchas foi analisada por meio de análise de correlação de Pearson. Tabelas de contingência e teste Qui-quadrado foram utilizados para comparar a proporção de danos entre machos e fêmeas em cada local

e entre locais. A concentração de cálcio entre os locais amostrados foi comparada por análise de variância simples. Para ambos os testes foi considerado nível de significância $P < 0,05$.

2.2 – Experimento 1 – Efeito da concentração de cálcio no desenvolvimento de *P. dolioides*

Para investigar o efeito da concentração de cálcio em *P. dolioides*, 5 massas de ovos foram cuidadosamente coletadas no ambiente e colocadas em um suporte com furos flutuando em caixa plástica (31 cm x 25 cm x 12,9 cm) com água e aeração, até eclosão dos filhotes. Os juvenis foram cultivados por sete dias em caixa plástica no mesmo recipiente com 5 L de água, sistema de aeração e alimentados com alface. Posteriormente, 540 filhotes foram selecionados aleatoriamente para compor o experimento.

A água utilizada no experimento, foi uma mistura de sais de fundo feita com 300 L de água deionizada, 36 g de sulfato de magnésio, 57,6 g de bicarbonato de sódio e 2,4 g de cloreto de potássio de acordo com Glass & Darby (2009). O experimento foi realizado durante 60 dias, com seis tratamentos relacionados as concentrações sulfato de cálcio na água dos gastrópodes: 0 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L e 100 mg/L de sulfato de cálcio di-hidratado. Estas concentrações de sulfato de cálcio correspondem a concentrações de 4,65, 9,31, 13,97, 18,62 e 23,28 mg/L de cálcio na água, respectivamente. Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas, compostas por três caixas (46 cm x 26 cm x 17 cm) com capacidade de 20 L de água.

No primeiro dia de experimento o comprimento da concha dos juvenis foi medido com auxílio de estereomicroscópio com câmera acoplado a um computador com software Motic - precisão (0,01 mm) e pesados com balança analítica (0,0001 g). Em seguida, 30 gastrópodes foram transferidos para cada caixa plástica supracitada com 15 L de água e alimentados diariamente, sendo nos primeiros 30 dias com alface e após este período com ração para peixe com 34% de proteína bruta com 10% da biomassa por dia. A quantidade de biomassa foi ajustada a cada 5 dias de acordo com os dados de biometria e mortalidade (Pires-Junior et al. 2019). Além disso, a cada 10 dias todos os gastrópodes foram analisados quanto à danos nas conchas, comumente ocasionados por deficiência de cálcio. Como consequência desses danos pode

ocorrer lesões formando buracos no ápice das conchas. Em todas as caixas foram colocados aeradores, mantendo a água oxigenada constantemente e a cada dois dias 25% da água foi sifonada para retirada de excretas e restos de alimentos, e a água retirada foi completada após este procedimento.

O experimento foi realizado sob condições naturais de luz com ciclo de 12 h dia/noite e temperatura ambiente. Foram aferidas semanalmente as variáveis da água como pH com medidor Hanna pH/ORP/ISE HI 98185, Nitrito e Amônia (mg/L) com testes colorimétricos, mensurados a partir de amostras retiradas dos tratamentos (tabela 1). No último dia de experimento os gastrópodes foram pesados com balança analítica (0,0001 g) e medidos com paquímetro (0,05 mm). Durante todo o experimento o pH foi mantido próximo a 8 para proporcionar maior sobrevivência e favorecer o desenvolvimento dos gastrópodes (Thomas et al. 1974; Pierre et al. 2017).

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos parâmetros de qualidade da água durante os 60 dias de experimento com *P. dolioides* em diferentes concentrações de sulfato de cálcio.

Tratamentos (mg/L de Ca ²⁺)	Temperatura da água (° C)	pH	Nitrito (mg/L)	Amônia (mg/L)
T1 (0)	27,95±0.35	8,4±0.29	0,15±0.14	0,058±0.026
T2 (20)	28,05±0.49	8,3±0.19	0,96±1.26	0,065±0.042
T3 (40)	28,15±0.49	8,2±0.20	1,09±1.17	0,045±0.029
T4 (60)	27,45±0.35	8,1±0.12	1,09±1.18	0,047±0.033
T5 (80)	27,35±0.49	8,1±0.09	1,22±1.10	0,061±0.058
T6 (100)	27,40±0.57	8,0±0.27	0,92±0.92	0,041±0.028

2.1.1 Análises de dados

O ganho de biomassa foi avaliado segundo a fórmula: $GB = (Pf \times Nf) - (Pi \times Ni)$, onde GB = ganho de biomassa, Pf = peso final, Nf = número de gastrópodes final, Ni = número de gastrópodes inicial, Pi = peso inicial. Para análise do crescimento foi calculada a taxa de crescimento específico seguindo a fórmula: $TCE = (\text{Log Pf} - \text{Log Pi}) \times 100 / T$, onde TCE = taxa de crescimento específico, Pf = peso final, Pi = Peso inicial e T = tempo transcorrido. O ganho de peso absoluto foi calculado a partir da equação: $GPB = Pf - Pi$, onde GPB = ganho de peso absoluto, Pf = peso final e Pi = peso inicial. O ganho de peso em porcentagem foi calculado a partir da equação: $GPP = (Pf - Pi) \times 100 / Pi$, onde GPP = ganho de peso em porcentagem, Pf = peso final e Pi = peso inicial. A taxa de sobrevivência foi avaliada seguindo a fórmula: $TS = (Nf \times 100)$

/ Ni, onde TS = taxa de sobrevivência, Nf = número de gastrópodes final, Ni = número de gastrópodes inicial (Píres-Junior et al. 2019).

Os dados de ganho de biomassa, taxa de crescimento específico, ganho de peso absoluto e ganho de peso em porcentagem dos juvenis foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como os dados foram normais, foi empregada análise de variância simples, complementada com o teste de Tukey para comparação dos dados. Foi utilizado o teste Qui-Quadrado e tabela de contingência para análise da proporção dos indivíduos que sobreviveram ao término do experimento entre os tratamentos. O tamanho e o peso dos juvenis em relação ao tempo de cultivo foram investigados por análise de covariância e teste F. Os dados da proporção de gastrópodes com danos nas conchas entre os tratamentos e dias de cultivo foram transformados em arco seno para atender os pressupostos da ANOVA. Estes foram analisados por análise de variância fatorial. Foi adotado nível de significância $P < 0,05$.

2.2.2 Determinação da concentração de cálcio nos gastrópodes

Ao término do experimento 1, a determinação da concentração de cálcio foi realizada no gastrópode inteiro (tecidos moles) e também na concha separadamente. Para determinação da concentração de cálcio no gastrópode inteiro, foram utilizados quatro gastrópodes de cada caixa, totalizando três amostras compostas por quatro gastrópodes para cada tratamento. Após 60 dias, os gastrópodes foram anestesiados por 1h com cloreto de magnésio, afim de evitar a perda da hemolinfa quando exposto ao etanol, em seguida preservados em etanol 70%. No dia seguinte, os gastrópodes preservados foram enxaguados com água deionizada e a parte mole separada da concha. As conchas foram descartadas e os animais inteiros secos em estufa a 90 °C por 24 h. Posteriormente, os gastrópodes secos foram pesados em balança analítica (0,0001 g) e aquecidos em forno mufla à 500 °C por 1,5 h. Em seguida, as cinzas foram pesadas em balaça analítica (0,0001 g) para a determinação do cálcio. O cálcio (g) foi determinado pela multiplicação do peso da cinza por 0,40 (Brodersen & Madsen 2003). O percentual de cálcio foi calculado dividindo a quantidade de cálcio pelo peso seco total do tecido e multiplicado por 100 (Glass & Darby 2009).

Para determinação da concentração de cálcio nas conchas, selecionamos três conchas de cada réplica totalizando nove amostras por tratamento. A técnica utilizada foi descrita por Soído et al. (2009), na qual os gastrópodes foram colocados em água

fervente por 30 segundos e removidos os tecidos moles. As conchas foram secas em temperatura ambiente por 4 dias e pesadas. Em seguida, colocadas em cadinhos de porcelana previamente enxaguados com ácido nítrico concentrado (HNO_3) e calcinadas em mufla a $450\text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. As cinzas foram pesadas e diluídas em 50 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado. A solução foi mantida em um digestor por 6 h, adicionando 2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para permitir o clareamento da solução resultante. Posteriormente, a amostra foi diluída 100 vezes em água destilada (1:100) e cinco alíquotas de 25 mL foram utilizadas para a determinação do cálcio usando EDTA de acordo com Baird et al. (2017). A massa de carbonato de cálcio foi calculada usando o volume de EDTA desperdiçado no processo de titulação e expresso em mg de CaCO_3/g de cinza (Soído et al. 2009).

2.2.3 Análises de dados

Os dados de porcentagem de cálcio nos caracóis inteiros de cada tratamento foram transformados em arco seno para atender os pressupostos da ANOVA. Posteriormente, o cálcio nos caracóis inteiros foi comparado entre os tratamentos por análise de variância de uma via e complementada com o teste de Tukey. A concentração de cálcio das conchas dos gastrópodes cultivados em diferentes concentrações de cálcio na água foi comparada teste Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn para comparação entre os tratamentos. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis pois os dados não apresentaram normalidade, que foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi adotado nível de significância $P < 0,05$ para todos os testes.

2.2.4 Caracterização da microestrutura das conchas de *Pomacea dolioides*

Para a caracterização estrutural das conchas, foram utilizadas três conchas do ambiente e três conchas de cada tratamento (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L de cálcio). As conchas foram cortadas com o auxílio de uma tesoura de aço inox. Foi feito um corte perpendicular à linha de crescimento da concha medindo 0,5cm x 1,5cm, de forma que se pudesse visualizar a linha de crescimento e as camadas já calcificadas anteriormente (Figura 2). Estas foram encaminhadas para o Laboratório de Histologia e Microscopia Eletrônica da UNESP para análise. As amostras foram fixadas diretamente nos “stubs” e revestidas com jato de ouro (5nm) em um Denton Vacuum Desk II, com jateamento. As conchas de cada tratamento foram fotografadas com um

microscópio eletrônico de varredura (Zeiss Evo 10) usando um feixe de elétrons de 10-15 kV. As análises foram feitas pela Técnica Cláudia Fiorillo, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando José Zara, coordenador do laboratório. A face do corte para análise seguiu a ilustração da Figura 2. Esta ficou voltada para os detectores na tomada de imagens, na qual A indica a região mais nova (área de crescimento) e B a região mais antiga da concha (calcificada) (Figura 2). A espessura das conchas fotografadas foram medidas (μm) utilizando o programa Image J.

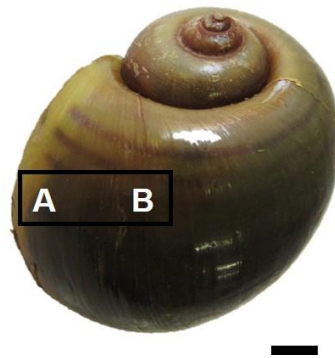


Figura 2. Ilustração do corte realizado nas conchas dos gastrópodes *P. dolioides* para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: área de crescimento da concha, B: área calcificada. Barra de escala= 0,5 cm

2.2.5 Análises de dados

A espessura das conchas entre os tratamentos foi comparada pelo teste Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis pois os dados não apresentaram normalidade, verificado pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi adotado nível de significância $P < 0,05$ para todos os testes.

3. RESULTADOS

Ocorrência de danos nas conchas de P. dolioides

Os gastrópodes coletados ($n= 423$) apresentaram comprimento médio de $39,32 \pm 11,28$ mm e a proporção de gastrópodes com danos (furos) nas conchas diferiu significativamente entre locais amostrados ($\chi^2= 160,170$; $GL= 4$; $P< 0,0001$), sendo maior no Jacarezinho (92%), Bairro Mamud Amed (85%) e Bairro da Paz (68%) e menor no Lago do Canaçari (17%) e Centenário (21%) (Figura 3). Esses danos foram observados principalmente no ápice da concha e não há diferença significativa entre a proporção de danos e o sexo dos gastrópodes observados ($\chi^2= 0,598$; $GL= 1$; $P= 0,4392$) (Figura 4). A água dos ambientes analisados apresentaram pH em torno de $6,5 \pm 0,24$ e a concentração de cálcio variou significativamente entre os locais ($F= 108,367$; $GL= 4$; $P<0,0001$), com as maiores concentrações registradas no Lago do Canaçari, Bairro Mamud Amed e Bairro da Paz (10,73, 8,67 e 7,84 mg/L) e menor no Jacarezinho e Centenário (4,13 e 4,95 mg/L respectivamente (Figura 3). Também, não houve correlação entre a proporção de danos com a concentração de cálcio nas áreas investigadas ($r= -0,30$; $p= 0,6171$) (Figura 3).

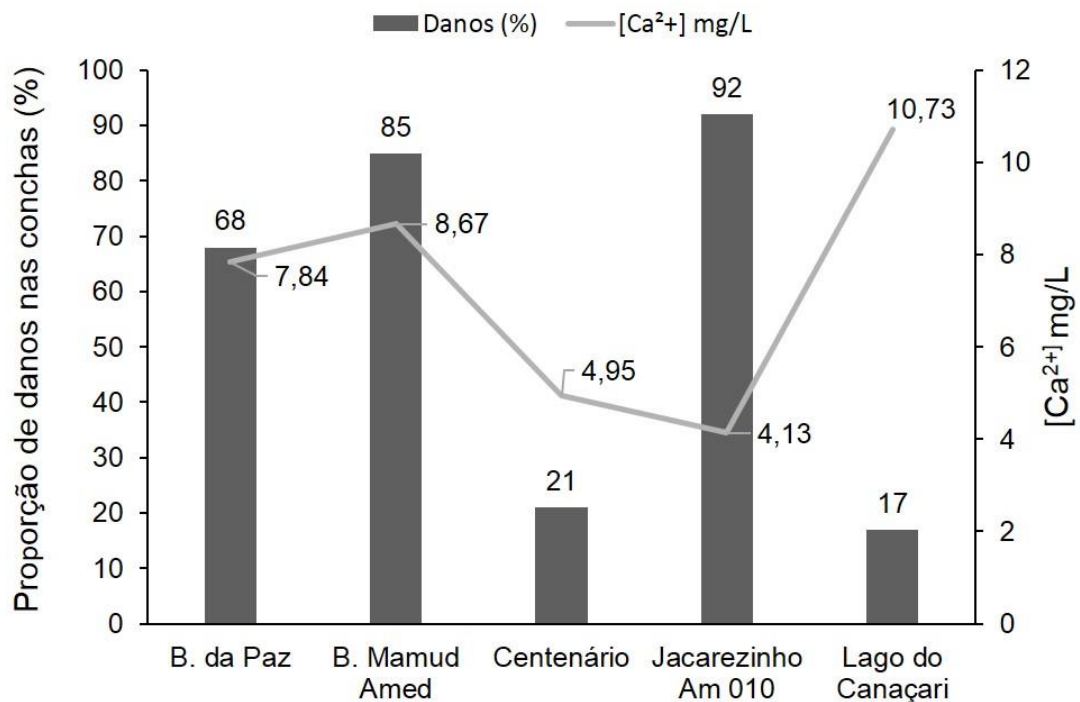


Figura 3. Relação entre a proporção de danos nas conchas (%) e a concentração de cálcio (mg/L) nos locais amostrados.

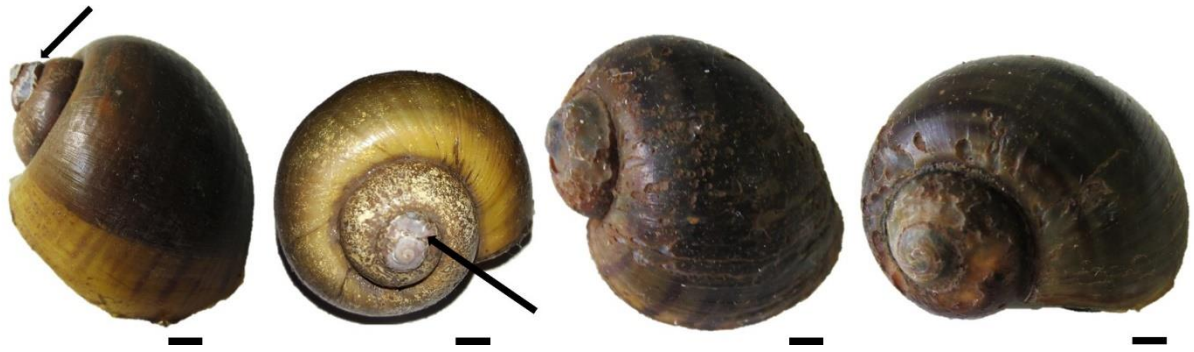


Figura 4. Superfície da concha de *P. dolioides* coletadas no ambiente. As setas indicam os danos (furos) nas conchas. Barra de escala= 0,5 cm

A proporção de danos nas conchas no laboratório apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($F(25,72)= 10,663$; $GL= 5$; $P< 0,001$) com aparecimento de furos nas primeiras espiras da concha a partir do dia 30 e aumento da proporção de gastrópodes lesionados ao longo do tempo (Figura 5). Os tratamentos com maiores concentrações de sulfato de cálcio (60, 80 e 100 mg/L) apresentaram aumento de lesões a partir de 40 dias.

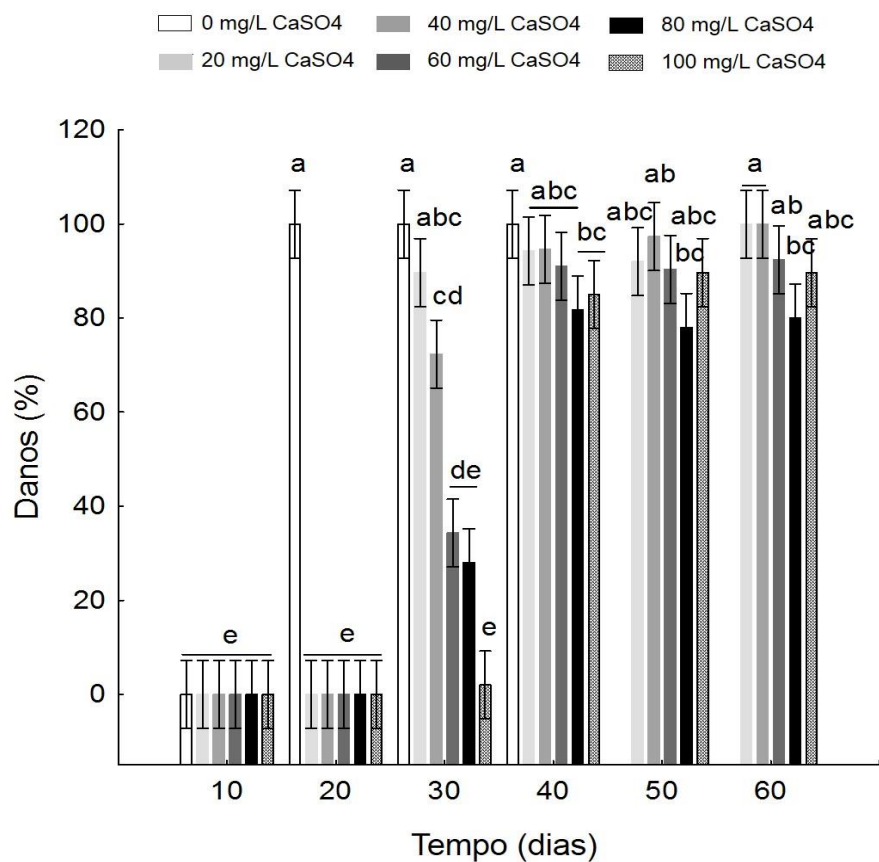


Figura 5. Proporção de danos nas conchas ao longo do tempo em *P. dolioides* mantidas em diferentes concentrações e cálcio na água.

Efeito da concentração de cálcio no desenvolvimento de *P. dolioides*

A taxa de sobrevivência dos juvenis ao longo de 60 dias apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($\chi^2= 21,846$; $GL= 4$; $P=0,0002$), com sobrevivência de 84 % no tratamento com maior concentração de cálcio (100 mg/L) e de 0 % na ausência de cálcio (0 mg/L), no qual os filhotes não sobreviveram por mais de 40 dias.

Os tratamentos com maiores concentrações de cálcio (80 e 100 mg/L) apresentaram valores significativamente maiores para ganho de biomassa ($F= 10,1445$; $GL= 4$; $P=0,001514$) e ganho de peso absoluto ($F= 37,399$; $GL= 4$; $P<0,0001$). A taxa de crescimento específico ($F= 9,25$; $GL= 4$; $P=0,002154$) e ganho de peso em porcentagem ($F= 8,6735$; $GL= 4$; $P=0,002737$) foram maiores a partir de 60 mg/L de cálcio (Figura 6).

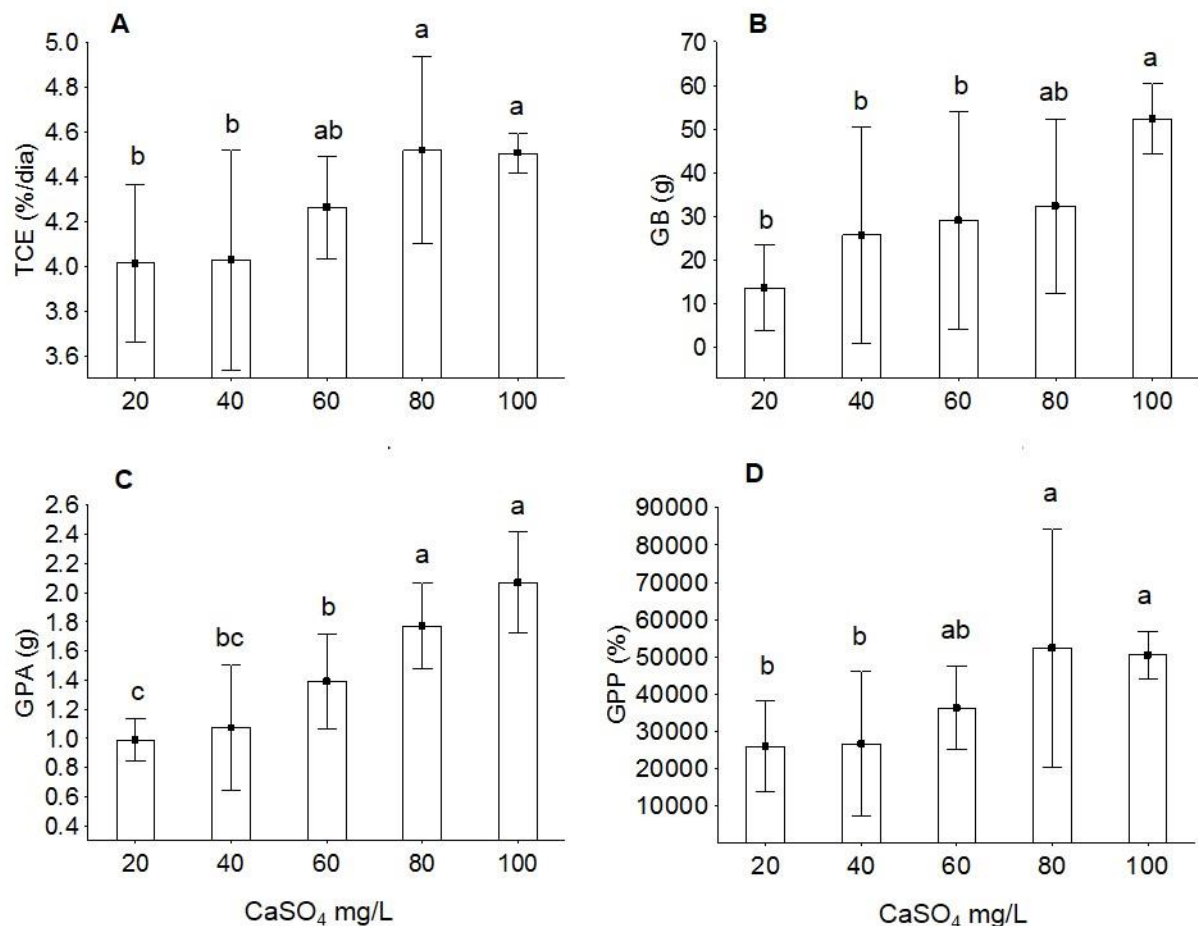


Figura 6. Parâmetros de desenvolvimento de *P. dolioides* submetidos a cinco concentrações de cálcio durante 60 dias. TCE= taxa de crescimento específico (A); GB= ganho de biomassa (B); GPA= ganho de peso absoluto (C); GPP= ganho de peso em porcentagem (D).

Na figura 7 pode-se observar a comparação entre as retas da relação comprimento da concha e dias de cultivo, onde o tratamento 6 apresentou diferença significativa entre as concentrações de cálcio testadas (ANCOVA; $F= 79,782$; $GL= 4$; $P<0,0001$) apresentando maior crescimento dos gastrópodes. A inclinação das retas da relação dias de cultivo e ganho de peso diferiu significativamente entre os tratamentos (ANCOVA; $F= 52,148$; $GL= 4$; $P<0,0001$). Na Figura 8 pode-se notar que o tratamento 6 proporcionou maior ganho de peso para *P. dolioides*.

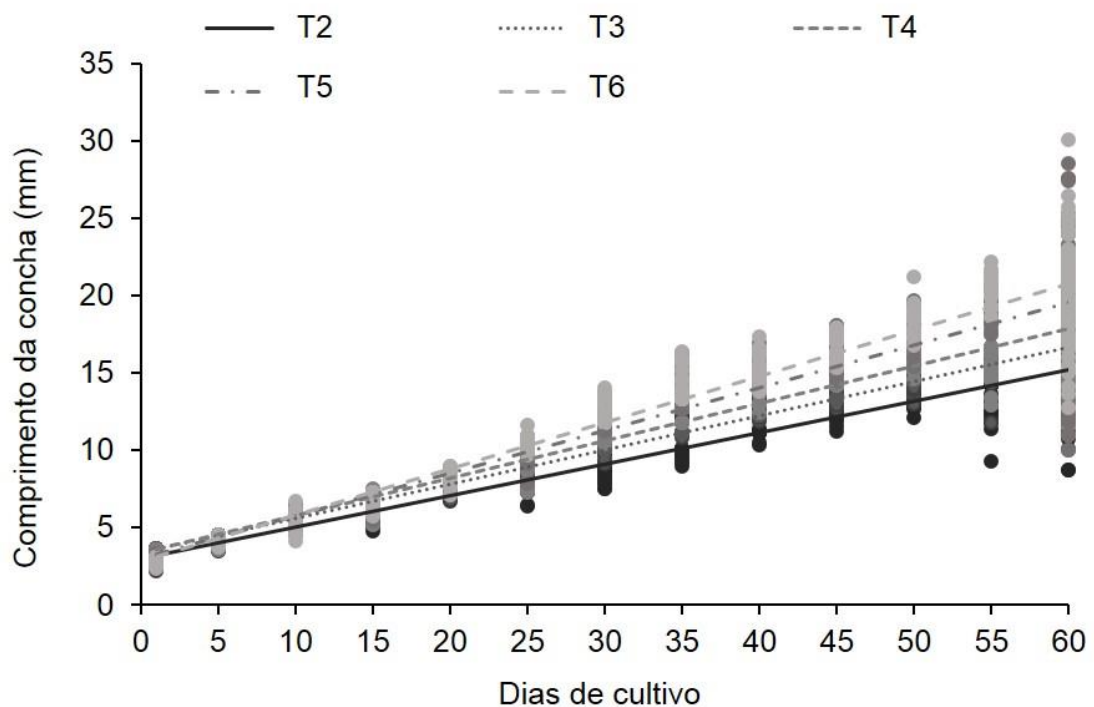


Figura 7. Relação entre o tempo de experimento (dias) e o comprimento da concha (mm) de *P. dolioides* em diferentes concentrações de cálcio, (T= tratamento).

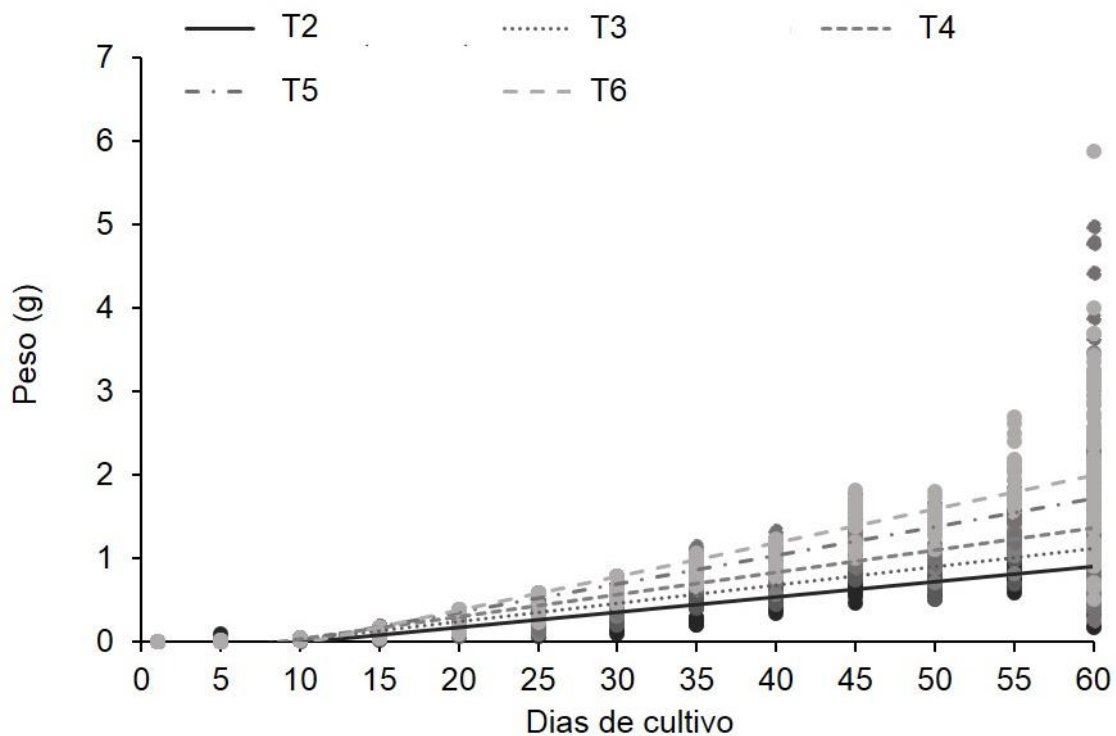


Figura 8. Relação entre o tempo de experimento (dias) e o ganho de peso (g) de *P. dolioides* submetidos a diferentes concentrações de cálcio, (T= tratamento).

A porcentagem de cálcio nos caracóis inteiros foi diferente entre os tratamentos ($F= 26,26$; $GL= 4$; $P=0,000028$). O cálcio foi significativamente maior nos caramujos tratados com 60, 80 e 100 mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($20,59 \pm 1,2\%$) em comparação com os caramujos tratados com 20 e 40 mg/L ($15,82 \pm 0,82\%$) (Figura 9).

A concentração de carbonato de cálcio nas conchas apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($H= 23,35539$; $GL= 4$; $P= 0,0001$), com maior conteúdo de CaCO_3 nos gastrópodes submetidos a concentração de 80 mg/L de CaSO_4 . Contudo, estatisticamente a concentração de 80 mg/L não diferiu da concentração de 40 e 60 mg/L para a quantidade de carbonato de cálcio presente nas conchas. Os gastrópodes submetidos a concentração de 80 mg/L também apresentaram maior peso de conchas e cinzas (Tabela 2).

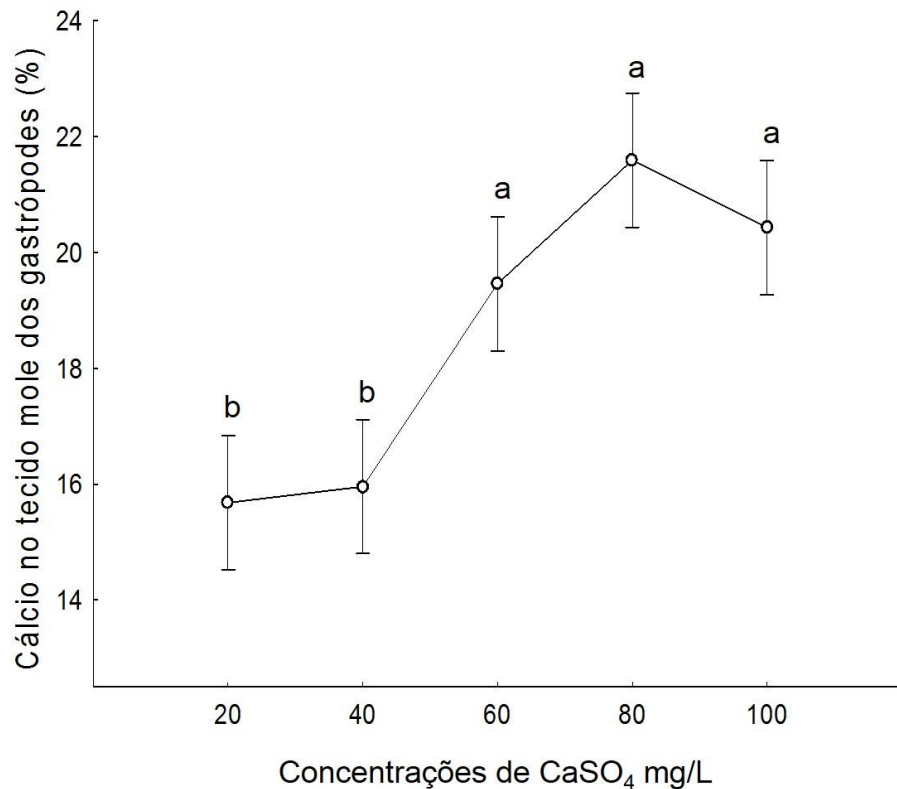


Figura 9. Porcentagem de cálcio nos gastrópodes submetidos a diferentes concentrações de sulfato de cálcio.

Tabela 2. Valores do peso da concha, das cinzas e da massa de carbonato de cálcio das conchas de *P. dolioides*.

Sulfato de cálcio mg/L	Peso das conchas (g)	Peso da cinza (g)	Massa (mg de CaCO ₃ /g de cinza)
20	0,5158	0,4374	73,68 ± 1,02 ^c
40	1,2508	1,1567	84,63 ± 0,39 ^{abc}
60	1,7232	1,5778	86,53 ± 0,57 ^{ab}
80	3,0453	2,7625	89,06 ± 0,30 ^a
100	2,6747	2,418	82,54 ± 0,23 ^{bc}

A microscopia eletrônica de varredura nas conchas de *P. dolioides* revelou protuberâncias perióstracais triangulares em fileiras próximos a abertura da concha (Figura 10A e B). Uma estrutura nacarada com cristais de aragonita em forma de placas disposta em colunas (Figura 10C e D) e uma estrutura lamelar cruzada, no qual cada lamela é construída com longas agulhas de aragonita orientadas da mesma maneira (Figura 10C e E). Não houve diferença significativa na espessura das conchas entre as diferentes concentrações de CaSO₄ testadas ($H= 8,866667$; $GL= 4$;

$P= 0,0645$). No entanto, existe tendência de que nas maiores concentrações de cálcio (60, 80 e 100 mg/L CaSO_4) a concha apresente espessura maior (Figura 11). Também observamos que nas três concentrações maiores a estrutura lamelar cruzada está maior e mais evidente (Figura 12C, D e E).

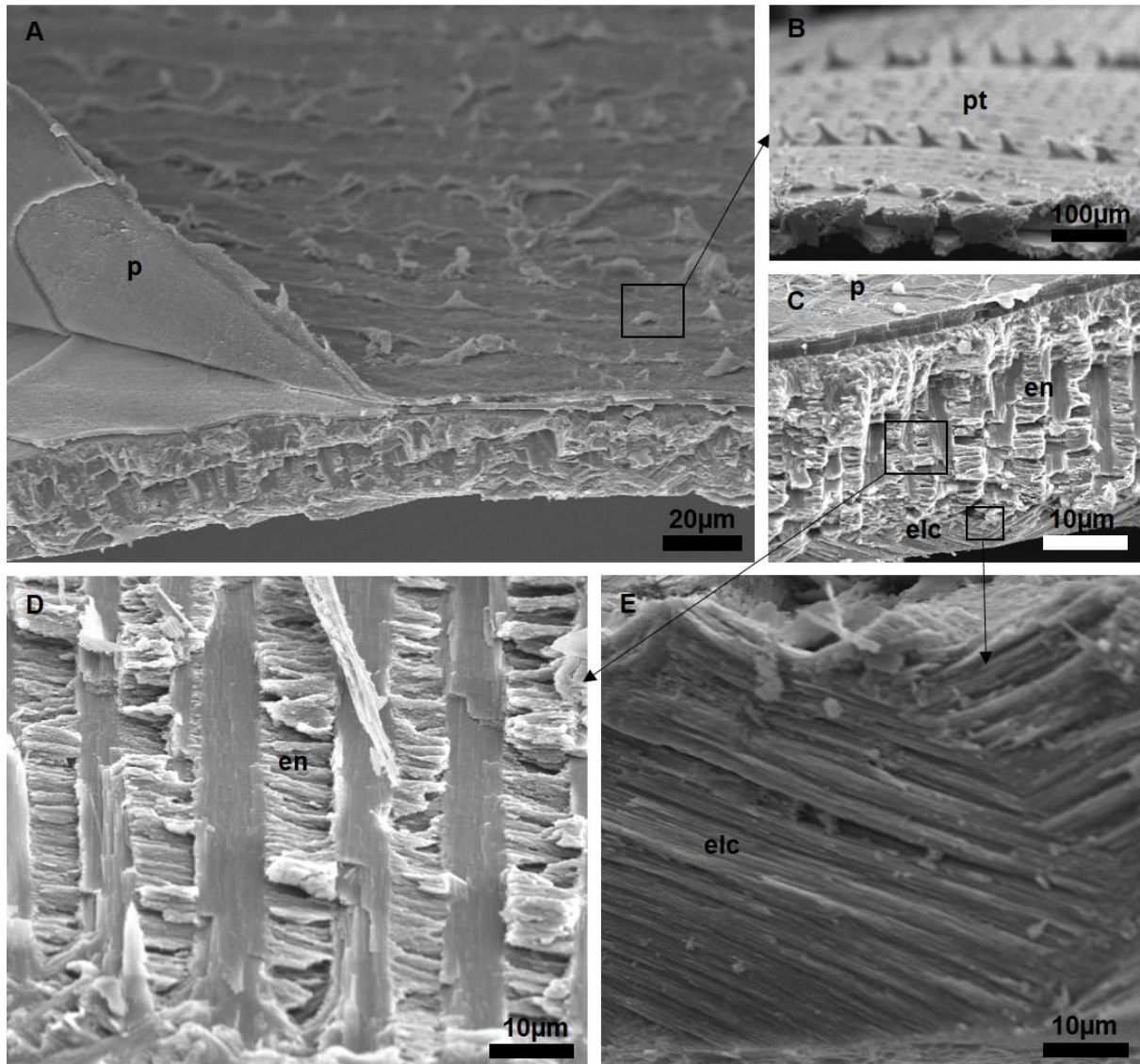


Figura 10. Caracterização estrutural da concha de *Pomacea dolioides* (A a E). Perióstraco (p), protuberâncias perióstracais triangulares (pt), estrutura nacarada (en), estrutura lamelar cruzada (elc).

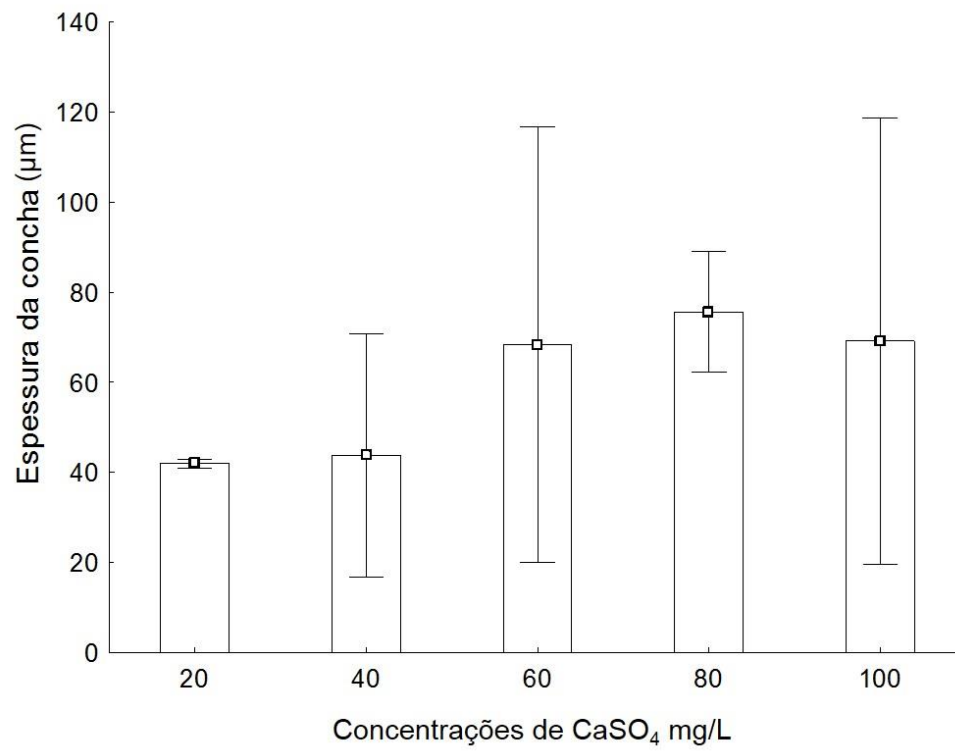


Figura 11. Espessura das conchas (µm) de *Pomacea dolioides* submetidas a diferentes concentrações de sulfato de cálcio.

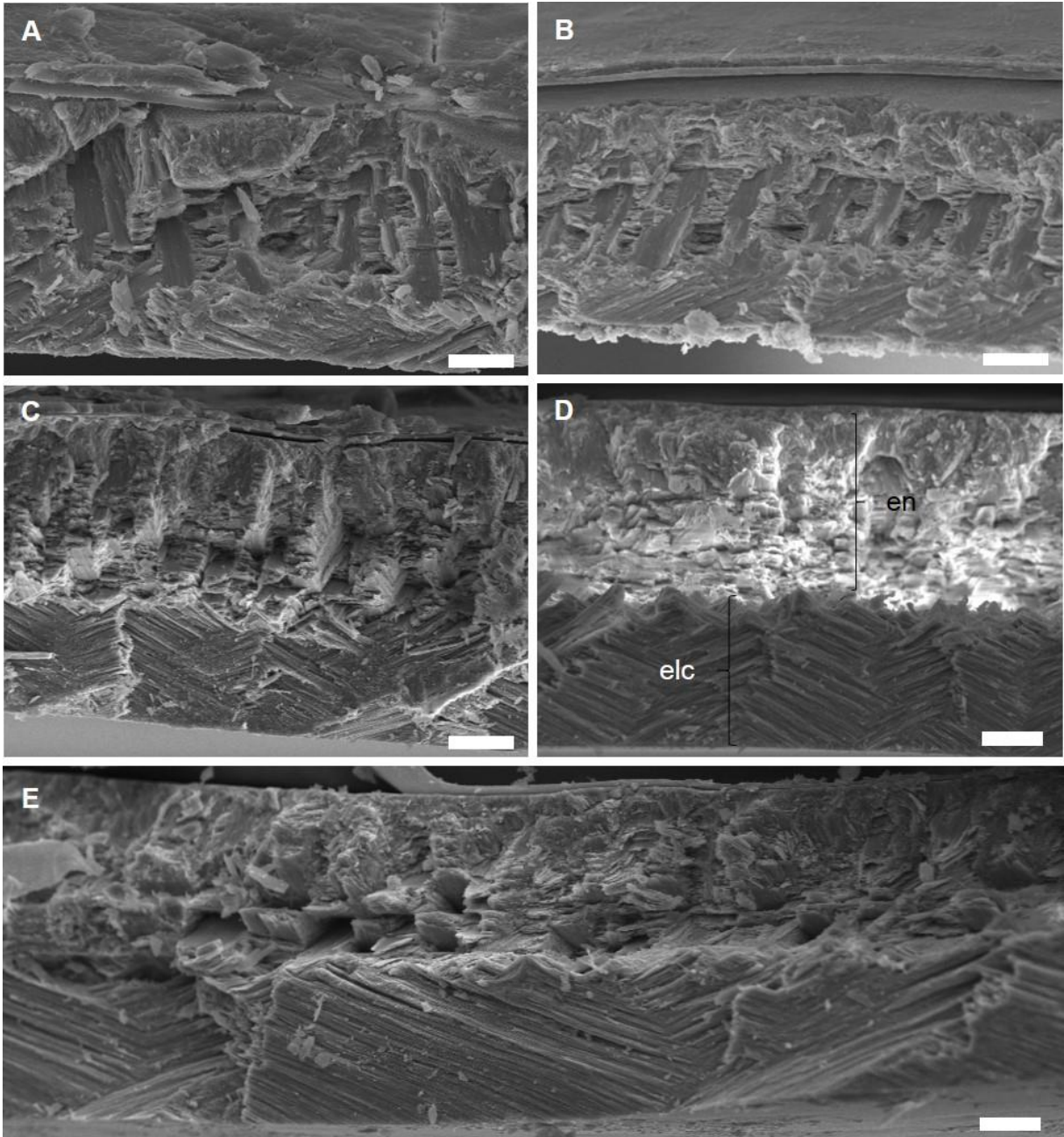


Figura 12. Caracterização estrutural da concha de *Pomacea dolioides* (A a E). A= 20, B=40, C= 60, D= 80 e E= 100 mg/L de sulfato de cálcio. Estrutura nacarada (en), estrutura lamelar cruzada (elc). Barra de escala= 10 μ m

4. DISCUSSÃO

Ocorrência de danos nas conchas de P. dolioides

A proporção de danos nas conchas registrada no presente trabalho corroboram com o estudo desenvolvido por Alcantara et al. (2015). Estes autores relataram 80,77% de erosão no vértice das conchas de *Pomacea maculata*, sugerindo que essas lesões ocorrem muitas vezes porque os gastrópodes estão localizados um por cima do outro para raspar a superfície, devido a necessidade de gastar a rádula, deficiência de alguns nutrientes como por exemplo o cálcio ou a necessidade de ingestão de perifíton. No presente estudo não observamos grandes concentrações de gastrópodes, os mesmos sempre estavam dispersos no ambiente aderidos ao caule da vegetação sob a água ou enterrados. Apesar disso, a proporção de danos nas conchas de *P. dolioides* no ambiente pode estar relacionada a outros fatores e não somente a concentração de cálcio dissolvido na água e futuras observações em campo podem elucidar este fato. Andrade & Nogueira (2018) ao estudar a *P. dolioides* observou que a espécie apresenta irregularidades na superfície externa da concha, devido às características dos anéis de crescimento que podem gerar imperfeições na concha, concluindo que, apesar de possuir uma camada de proteção orgânica, a concha de *P. dolioides* é muito suscetível à degradação natural, principalmente, por areia e pedras (Andrade & Nogueira 2018).

Em laboratório a ocorrência de danos variou ao longo do tempo entre as diferentes concentrações de cálcio testadas. Nos tratamentos com menores concentrações de CaSO_4 (0, 20 e 40 mg/L) as lesões foram mais acentuadas. Estes gastrópodes não apenas apresentaram baixas taxas de crescimento e peso, como também tinham conchas extremamente finas e quebradiças, devido ao pouco cálcio que os filhotes possuíam para formação das conchas. Os danos também apareceram, em proporção menor, nos animais mantidos em ambientes com mais cálcio. De acordo, Glass & Darby (2009), a baixa disponibilidade cálcio pode contribuir para o crescimento lento e demora no reparo das lesões.

Efeito da concentração de cálcio no desenvolvimento de P. dolioides

O cálcio é um nutriente vital na biologia dos gastrópodes de água doce (Bukowski & Auld 2014). Além do cálcio, características como temperatura, pH, salinidade, qualidade da água e disponibilidade de alimento influenciam a distribuição

dos moluscos, o crescimento e a estrutura das conchas (Estebenet 1995; Martin et al. 2001; Silva & Debacher 2010; Suzuki & Nagasawa 2013). Assim, as variáveis para a qualidade da água descritas para o experimento em laboratório estão de acordo com os valores de referência para o cultivo de *Pomacea* (Rodriguez & Carranza 2007; Garr et al. 2011; Posch et al. 2012; Pierre et al. 2017). Durante todo o experimento o pH registrado ficou próximo a 8, o que favorece maior sobrevivência e desenvolvimento dos gastrópodes, pois em ambientes acidificados ($\text{pH} < 5,7$) as respostas fisiológicas dos moluscos ficam comprometidas (Lewis et al. 2007) e para sobreviverem nesses ambientes os moluscos recorrem ao CaCO_3 presente nas células em resposta ao estresse ácido (Machado et al. 1988). Thomas et al. (1974) também descreveram que valores de pH de 7,9 a 8,3 promovem o crescimento dos gastrópodes. Além disso, o cálcio do ambiente influencia no pH da hemolinfa e nas concentrações desses íons nos órgãos que atuam no armazenamento de cálcio (Davies & Erasmus, 1984; Ebanks et al. 2010).

A sobrevivência dos gastrópodes submetidos a diferentes concentrações de cálcio diferiu da taxa de sobrevivência observada por Glass & Darby (2009) em *P. paludosa*, que foi de 100% para todos os tratamentos, inclusive na menor concentração de sulfato de cálcio 10 mg/L. No presente estudo, a sobrevivência dos juvenis ficou entre 0% e 84% para os tratamentos referentes a 0 e 100 mg/L de CaSO_4 , respectivamente. A mortalidade de 100% dos caracóis na ausência de cálcio, também foi relatada por Madsen (1987) no gastrópode *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) nas primeiras quatro semanas de experimento. Segundo Nduku & Harrison (1976), o cultivo de caracóis em baixas concentrações de cálcio levam os animais ao estresse, devido ao baixo nível de cálcio para os processos fisiológicos normais e construção da concha. De acordo com os autores supracitados, a uma concentração de 2 mg/L de Ca^{2+} os gastrópodes já estão sob estresse.

As menores taxas de crescimento específico e ganho de peso foram associadas as menores concentrações de CaSO_4 (20 e 40 mg/L) e (20, 40 e 60 mg/L), respectivamente. De acordo com Thomas et al. (1974), as taxas de crescimento absoluto e específico tendem a aumentar quando as concentrações de Ca^{2+} aumentam, resultando também em um aumento na porcentagem de peso. Glass & Darby (2009), também verificaram diferenças significativas no crescimento de *P. paludosa* entre as três concentrações mais altas (40, 80 e 100 mgL^{-1}) e as duas mais

baixas (10 e 20 mgL⁻¹). Além disso, o comprimento da concha e o ganho de peso dos juvenis ao longo de 60 dias de experimento foi associado ao aumento da concentração de CaSO₄, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. Madsen (1987) e Brodersen & Madsen (2003), também observaram que o diâmetro da concha e o peso (inorgânico e orgânico) aumentam com a concentração de cálcio em outras espécies de gastrópodes. Dessa forma, a taxa de absorção de cálcio do meio externo está significativamente relacionada com a taxa de crescimento da concha (Thomas et al. 1974). Glass & Darby (2009), também sugeriram que pelo menos uma parte da concha dos gastrópodes origina-se do cálcio presente na água. O restante do cálcio absorvido pelos gastrópodes é proveniente da alimentação.

O aumento da concentração de CaSO₄ na água teve efeito significativo no teor de cálcio nos gastrópodes (tecido mole), com aumento da concentração de cálcio no gastrópode de acordo com aumento de cálcio na água. Dessa forma, nossos resultados não foram consistentes com Glass & Darby (2009), onde a porcentagem de cálcio nos gastrópodes inteiros não foi diferente entre os tratamentos. Isto pode indicar diferenças fisiológicas na absorção do cálcio dentro do gênero, pois, Glass & Darby (2009) tiveram desenho amostral similar quando investigaram *P. paudosa*. Contudo, as porcentagens de Ca²⁺ observadas no presente estudo foram semelhantes com as dos gastrópodes tratados com água do ambiente no estudo de Glass & Darby (2009)

Os resultados apresentados para o carbonato de cálcio nas conchas de *P. dolioides* seguiu o mesmo padrão encontrado para as taxas de crescimento, ganho de peso e porcentagem de cálcio nos animais inteiros, com efeitos significativos para as maiores concentrações de CaSO₄. A massa de carbonato de cálcio nas conchas foi maior nos gastrópodes submetidos a 80 mg/L de sulfato de cálcio, inferindo que *P. dolioides* absorve uma quantidade de cálcio suficiente para os seus processos metabólicos quando está inserido num ambiente onde a concentração de cálcio é maior do que necessita. Em contrapartida, em ambientes onde a concentração de cálcio é muito baixa, os gastrópodes absorvem o cálcio dissolvido na água, mas as taxas de crescimento são baixas e as conchas se tornam finas (Thomas et al. 1974; Madsen 1987; Brodersen & Madsen 2003).

A massa de carbonato de cálcio nas conchas de *P. dolioides* foi inferior ao encontrado por Soído et al. (2009) no gastrópode *Bradybaena similaris* (Férussac,

1821) e por Darwin & Padmavathi (2018) nos gastrópodes *Telescopium telescopium* (Linnaeus, 1758) e *Pirenella cingulata* (Gmelin, 1791), com $874,24 \pm 56,617$, $621 \pm 11,37$ e $420 \pm 6,8$ mg de CaCO_3/g de cinza, respectivamente. Estas diferenças podem estar relacionadas a espessura da concha, dureza, habitats e o tipo de estrutura cristalina de CaCO_3 que variam de acordo com cada espécie. Comparado com a concha dura de muitos gastrópodes, a concha das *Pomacea* é fina, frágil e facilmente danificada em seu ambiente (Yang et al. 2016).

As análises de microscopia de varredura nas conchas de *P. dolioides* foram consistentes com os dados de Estebenet et al. (2006) com relação as protuberâncias perióstracais dispostos em espiral em *P. canaliculata*. Estudos desenvolvidos por Meenaksh et al. (1975) revelaram o componente mineral da concha de *P. paludosa* como aragonita. A estrutura cristalina da concha de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) também apresentou um biomaterial constituído basicamente por CaCO_3 com predominância de aragonita e estruturas de nácar colunar e lamelar cruzada (de Paula & Silveira, 2009; de Paula et al. 2010). De acordo com Liang et al. 2010, a estrutura lamelar cruzada tem a propriedade de crescimento rápido, justificando o fato desta estrutura ser maior nas maiores concentrações de sulfato de cálcio, visto que nas concentrações de 60, 80 e 100 mg/L de CaSO_4 as taxas de crescimento foram maiores em relação as concentrações mais baixas (20 e 40 mg/L).

Nossos resultados indicam que existe relação entre o cálcio dissolvido na água e o desenvolvimento do gastrópode *P. dolioides* em relação ao comprimento, peso inorgânico e orgânico e o cálcio da concha e do caracol inteiro. Em virtude disso, é importante considerar o ambiente onde o animal está inserido no processo de aquisição de íons Ca^{2+} (EBANKS et al. 2010). É importante destacar ainda, que os dados expostos podem servir de referência para o cultivo da espécie, uma vez que apresentam potencial como matéria prima de alto valor biológico na elaboração de ração para animais (Barboza & Romanelli 2004).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, concluí-se que a presença de danos nas conchas no ambiente pode estar relacionada a outros fatores e não somente à concentração de cálcio. E estudos de observação dos gastrópodes em locus pode auxiliar a elucidar esta questão. O cálcio dissolvido na água foi essencial para o gastrópode *P. dolioides*, visto que, na ausência de cálcio os gastrópodes não sobreviveram por mais de 40 dias, apresentando melhor desenvolvimento a partir de 60 mgL^{-1} de CaSO_4 . Os resultados para as taxas de crescimento, ganho de peso e porcentagem de cálcio nos animais inteiros apresentaram ganhos significativos nas maiores concentrações de CaSO_4 (60, 80 e 100 mg/L). A massa de carbonato de cálcio presente nas conchas de *P. dolioides* apresentou melhor resultado a partir de 40 mg/L de sulfato de cálcio. Dessa forma, a uma concentração de 60 mg/L de sulfato de cálcio os gastrópodes *Pomacea dolioides* apresentam um bom desenvolvimento para futuros cultivos da espécie.

6. REFERÊNCIAS

ALCÁNTARA, F.; MANCHINARI, C.; FRANCO, P.; NÚÑEZ, J. Rasgos de vida de *Pomacea Maculata* (Gasteropoda, Ampullariida, Perry 1810) en ambiente controlado. **Folia Amazónica**, v. 24, n. 1, p. 9-20, 2015.

ANDRADE, A. F.; NOGUEIRA, R. B. Mechanical characterization of the shell amazonian *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856). **Acta Zoológica Mexicana**, v. 34, p. 1-11, 2018.

BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; RICE, E. W. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23 ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2017: Part 3000 Metals 3500-Ca.

BITTENCOURT, M. M.; AMADIO, S. A. Proposta para identificação rápida dos períodos hidrológicos em áreas de várzea do rio Solimões-Amazonas nas proximidades de Manaus. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 303-308, 2007.

BUKOWSKI, S. J.; AULD, J. R. The effects of calcium in mediating the inducible morphological defenses of a freshwater snail, *Physa acuta*. **Aquatic Ecology**, v. 48, p. 85-90, 2014.

BRODERSEN, J.; MADSEN, H. The effect of calcium concentration on the crushing resistance, weight and size of *Biomphalaria sudanica* (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia**, v. 490, p. 181-186, 2003.

BUKOWSKI, S. J.; AULD, J. R. The effects of calcium in mediating the inducible morphological defenses of a freshwater snail, *Physa acuta*. **Aquatic Ecology**, v. 48, p. 85-90, 2014.

CURREY, J. D.; TAYLOR, J. D. The mechanical behaviour of some molluscan hard tissues. **J. Zool., Lond**, v. 173, p. 395-406, 1974.

DALESMAN, S.; BRAUN, M. H.; LUKOWIAK, K. Low environmental calcium blocks long-term memory formation in a freshwater pulmonate snail. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, p. 393-403, 2011

DARWIN, C. H.; PADMAVATHI, P. Preliminary assessment of calcium in six molluscan shells of Tamilnadu coast, India. **Ecology, Environment & Conservation**, v. 24, n. 1, p. 302-305, 2018.

DAUPHIN, Y.; CUIF, J. P.; CASTILLO-MICHEL, H.; CHEVALLARD, C.; FARRE, B.; MEIBOM, A. Unusual Micrometric Calcite–Aragonite Interface in the Abalone Shell *Haliotis* (Mollusca, Gastropoda). **Microscopy Microanalysis**, v. 20, p. 276-284, 2014.

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

EBANKS, S.C.; O'DONNELL, M.J.; GROSELL, M. Characterization of mechanisms for Ca^{2+} and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ acquisition for Shell formation in embryos of the freshwater common pond snail *Lymnaea stagnalis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 4092-4098, 2010.

ESTEBENET, A. L. Food and feeding in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). **The Veliger**, v. 38, n. 4, p. 277-283, 1995.

EWALD, M. L.; FEMINELLA, W. J.; LENERTZ, K. K.; HENRY, R. H. Acute physiological responses of the freshwater snail *Elimia flava* (Mollusca: Pleuroceridae) to environmental pH and calcium. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 150, p. 237-245, 2009.

FONSECA, A. M.; HATTORI, G. Y.; COSTA, M. B. da.; SANT'ANNA, B. S. Imposex in two apple snails of the Amazon. In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazon Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 47-65.

GREENAWAY, P. Calcium regulation in the freshwater mollusc, *limnaea stagnalis* (l.) (gastropoda: pulmonata) the effect of internal and external calcium concentration. **J. Exp. Biol.** v. 54. p. 199-314, 2010.

GLASS, N. H.; DARBY, P.C. The effect of calcium and pH on Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae), shell growth and crush weight **Aquatic Ecology**, v. 43, p. 1085-1093, 2009.

JUNK, W. J. 2000. Neotropical floodplains: a continental-wide view, p. 5-24. In: Junk, W.J., Ohly, J., Piedade, M.T.F. & Soares, M.G.M. (eds) *The Central Amazonian floodplain ecosystems: actual use and options for sustainable management*. Backhuys Publishers, Leiden.

LEWIS B. R.; JUTTNER, I.; REYNOLDS, B.; ORMEROD, S.J. Comparative assessment of stream acidity using diatoms and macroinvertebrates: implications for

river management and conservation. **Aquat. Conserv. Mar. Freshwater Ecosystem**, v. 17, p. 502–519, 2007.

LIANG Y, ZHAO J, WU C. The micro/nanostructure characteristics and the mechanical properties of *Hemifusus tuba* Conch shell. **Journal of Bionic Engineering**, v. 7, p. 307-313, 2010.

MACHADO, J.; COIMBRA, J.; SA, C.; CARDOSO, I. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 91, p. 645-651, 1988.

MADSEN, H. Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). **Journal of Applied Ecology**, v. 24, p. 823-836, 1987.

MARTIN, P. R.; ESTEBENET, A. L.; CAZZANIGA, N. J. Factors affecting the distribution of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) along its southernmost natural limit. **Malacologia**, v. 43, n. 1-2, p. 13-23, 2001.

MELO, I. B.; HOTTORI, G. Y.; SANT'ANNA, B. S. Reproduction and substrate selection for oviposition of the gastropod *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856). In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazonian Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 89-107.

NDUKU, W. K.; HARRISON, A. D. Calcium as a limiting factor in the biology of *Biomphalaria pfeifferi* (krauss), (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia**, v. 49, n. 2, p. 43-170, 1976.

PAULA, S. M. de.; SILVEIRA, M. Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods. **Micron**, v. 40, p. 669–690, 2009.

PAULA, S. M. de.; HUILA, M. F. G.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from *Pomacea lineate* shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media. **Micron**, v. 41, p. 983–989, 2010.

PASCHOAL, L. R. P.; OLIVEIRA, L. J. F. de. Histology and Histochemistry of the testes in two Amazonian apple snails. In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazonian Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 127-144.

PIERRE, S. M.; QUINTANA-ASCENCIO, P. F.; BOUGHTON, E. H.; JENKINS, D. G. Dispersal and local environment affect the spread of an invasive apple snail (*Pomacea maculata*) in Florida, USA. **Biological Invasions**, v. 19, p. 2647–2661, 2017.

PIRES-JÚNIOR, A. N.; HATTORI, G. Y.; SANT'ANNA, B. S. Effect of stock density of cultured Amazon Apple Snail *Pomacea dolioides* (Gastropoda: Ampullariidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, p. 1-8, 2019.

POSCH, H.; GARR, A. L.; PIERCE, R.; DAVIS, M. The effect of stocking density on the reproductive output of hatchery-reared Florida apple snails, *Pomacea paludosa*. **Aquaculture**, v. 360, p. 37-40, 2012.

RODRÍGUEZ, F. V. I.; CARRANZA, M. M. Validación del cultivo semi-intensivo de caracol Tote (*Pomacea flagellata*), en el trópico húmedo. **Revista AquaTIC**, v. 27, p. 16-30, 2007.

RUIZ, R. R.; ALENCAR, J. da. C. Comportamento fenológico da palmeira patauá (*Oenocarpus bataua*) na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 553-558, 2004.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SIMONE, L. R. L. **Land and freshwater mollusks of Brazil**. São Paulo: EGB/FAPESP, 2006. 390 p.

SOÍDO, C.; VASCONCELLOS, M. C.; DINIZ, A.G.; PINHEIRO, J. An Improvement of Calcium Determination Technique in the Shell of Molluscs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 93-98, 2009.

SUZUKI, M.; NAGASAWA, H. Mollusk shell structures and their formation mechanism. **Canadian Journal of Zoology**, v. 91, n. 6, p. 349-366, 2013.

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**, v. 43, n. 3, p. 839-860, 1974.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; PIMPAO, D. M. Diversity of Amazon Ampullariidae (Molusca; Caenogastropoda). In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazonian Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 1-20.

TUNHOLI, V.M.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; GARCIA, J.S.; MELLOSILVA, C.C.C.; MALDONADO, J.R.A.; RODRIGUES, M. Influence of *Echinostoma paraensei* (Lie and Basch, 1967) infection on the calcium content in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 266-269, 2011.

WATSON, A. M.; ORMEROD, S. J. The distribution of three uncommon freshwater gastropods in the drainage ditches of British grazing marshes. **Biological Conservation**, v. 118, p. 455-466, 2004.

YANG, S.; NI, L.; ZHAO, L.; YANG, J.; LIU, Q.; ZHANG, J.; HE, Z.; PENG, S. Repair process and enzymatic activity associated with induction of shell regeneration in the invasive species. **Molluscan Research**, v. 36, p. 207-212, 2016.

ZEIDAN, G. C.; Barroso, C.; Boehs, G. Efficiency of anesthetics on female gastropod *Littoraria angulifera*. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 44, n. 3, p. 304, 2018.

CAPÍTULO III

A Concentração de Cálcio na Água Interfere na Regeneração das Conchas do Gastrópode *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856)?



Resumo

A concha dos moluscos é uma estrutura externa rígida constituída de carbonato de cálcio, que suporta e protege os tecidos moles de predadores, resiste à pressão da água e possui a capacidade de regenerar áreas danificadas. Estas, geralmente sofrem quebra quando expostas a fatores ambientais externos. Assim, uma regeneração rápida é importante para a sobrevivência dos caracóis. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a taxa de sobrevivência e o tempo de regeneração da concha em juvenis de *Pomacea dolioides* após incisões com formatos distintos e submetidos a diferentes concentrações de cálcio. Para verificar o processo de regeneração nas conchas da espécie supracitada, foram coletados 210 gastrópodes. Uma incisão triangular e outra retangular, com 32 mm² de área, foram realizadas na região ventral da concha dos gastrópodes. Estes foram divididos em dois experimentos, um composto por seis tratamentos com diferentes concentrações de Ca²⁺ (0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L de sulfato de cálcio) e água deionizada composta com sais de fundo e outro utilizando água do ambiente por 10 dias. Após esse período, foi realizada uma nova indução e cultivados por mais 10 dias. Os caracóis foram verificados diariamente quanto ao período de regeneração e fotografados. A taxa de sobrevivência dos dois grupos foram de 99 e 98 %, respectivamente. O tempo médio de reparo foi de três dias para os dois grupos, com crescimento gradual da concha durante o tempo de regeneração. Não houve efeito significativo do tempo em relação ao tipo de corte, indução e concentração de cálcio. Para os gastrópodes regenerados na água do ambiente não houve diferença do tempo de regeneração em relação ao tipo de corte, já a relação tempo e indução apresentou diferença significativa. De acordo com os resultados apresentados, concluímos que o gastrópode *P. dolioides* possui capacidade de regenerar áreas danificadas com diferentes tipos de incisões e em diferentes concentrações de cálcio dissolvido em um tempo relativamente baixo. Como consequência eles podem prevenir infecções, predações e aumentar suas chances de sobrevivência e estabelecimento na natureza.

Palavras-chave: Pomacea, Incisão, Cálcio, Regeneração

Abstract

The shell of the mollusks is a rigid external structure consisting of calcium carbonate, which supports and protects the soft tissues of predators, resists water pressure and has the ability to regenerate damaged areas. These usually break when exposed to external environmental factors. Thus, rapid regeneration is important for snail survival. In this sense, the present study evaluated the survival rate and the time of regeneration of the shell in juveniles of *Pomacea dolioides* after incisions with different shapes and submitted to different concentrations of calcium. To verify the regeneration process in the shells of the aforementioned species, 210 gastropods were collected. A triangular and a rectangular incision, with an area of 32 mm², were made in the ventral region of the gastropod shell. These were divided into two experiments, one consisting of six treatments with different concentrations of Ca²⁺ (0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg / L of calcium sulfate) and deionized water composed with bottom salts and the other using water from the environment for 10 days. After that period, a new induction was performed and cultivated for another 10 days. Snails were checked daily for the regeneration period and photographed. The survival rates of the two groups were 99 and 98%, respectively. The average repair time was three days for both groups, with gradual growth of the shell during the regeneration time. There was no significant effect of time on the type of cut, induction and calcium concentration. For gastropods regenerated in ambient water, there was no difference in the regeneration time in relation to the type of cut, since the relationship between time and induction showed a significant difference. According to the results presented, we conclude that the gastropod *P. dolioides* has the capacity to regenerate damaged areas with different types of incisions and in different concentrations of dissolved calcium in a relatively short time. As a consequence they can prevent infections, predations and increase their chances of survival and establishment in the wild.

Keywords: *Pomacea*, Incision, Calcium, Regeneration

1. INTRODUÇÃO

Gastrópodes do gênero *Pomacea* são popularmente conhecidos na Amazônia como aruás e estão largamente distribuídos pelos estados brasileiros e em outros países da América Latina (Barbosa et al. 2016). *Pomacea dolioides* (Reeve, 1856) ocorre principalmente na região amazônica (Hayes et al. 2009), sendo encontrada no Brasil, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela (Simone 2006; Thiengo et al. 2017). Esta, apresenta conchas de cor marrom claro a amarelo esverdeado, normalmente com manchas concêntricas mais escuras, apresentando aspecto globoso com abertura ampla e oval e opérculo córneo (Pimpão & Martins 2009).

A concha dos moluscos é caracterizada como uma estrutura externa rígida, formada a partir da deposição contínua do nácar na superfície interna da concha que se inicia logo nos primeiros estágios de desenvolvimento (Chateigner et al. 2000). Esta suporta e protege os tecidos que compõem a parte mole de predadores, resiste à pressão da água do meio (Silva e Debacher 2010; Li et al. 2017) e possui a capacidade de regenerar áreas danificadas (Kádár 2008; Liu et al. 2013). Estes exoesqueletos protetores, geralmente sofrem quebra quando expostos a fatores ambientais externos como dessecação, exposição à luz UV, bactérias (Trinkler et al. 2010; 2011), epibiontes (Marshall & Day 2001) e predadores (Cadée 2011). Uma vez quebrada, o molusco fica mais suscetível a infecções e predações (Yang et al. 2016).

Além disso, a concha é um produto da biomineralização de cristais de CaCO_3 , proteínas da matriz e outros biopolímeros (Yu et al. 2006). A anidrase carbônica também desempenha um papel importante na mineralização dos invertebrados, participando da biomineralização do íon carbonato (CO_3^{2-}) e do transporte celular de cálcio (Ca^{2+}). Este mecanismo é essencial para o rápido desenvolvimento das conchas (Yu et al. 2006; Yang et al. 2016). Assim, o carbonato de cálcio é o principal componente da concha (Lowenstam 1981), com o cálcio do manto sendo originado pela absorção e secreção de cálcio pelo sistema digestivo ou absorção direta pelo corpo no meio ambiente (Morrison & Cochrane 2008; Yang et al. 2016).

Estudos demonstraram que os hemócitos estão envolvidos na regeneração das conchas (Mount et al. 2004; Kádár et al. 2008; Trinkler et al. 2011; Li et al. 2016). Estes, contêm sais insolúveis de carbonato de cálcio que transportam e liberam

cristais de calcita para os locais de reparo, onde são integrados à concha (Mount et al. 2004; Kádár 2008; Takahashi et al. 2011). Mount et al. (2004) propuseram que os granulócitos também podem transferir e liberar cristais de cálcio no local do reparo da concha. Dessa forma, o íon carbonato é um dos responsáveis pela construção do carbonato de cálcio, e mudanças na concentração do ambiente podem afetar a capacidade dos organismos calcificantes de precipitar CaCO_3 (Rao 2017). Assim, uma regeneração rápida é importante para resistência ao estresse e sobrevivência desses animais (Yang et al. 2016, Liu et al. 2017).

O tempo necessário para regenerar as conchas danificadas varia entre as diferentes espécies e habitats de moluscos. No gastrópode marinho *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758), um adesivo orgânico marrom apareceu alguns dias após o dano e a abertura regenerou depois de 15 dias, sendo que o processo de remineralização nos adultos foi concluído após 2 meses (Fleury et al. 2008). No mexilhão *Bathymodiolus azoricus* (Cosel & Comtet, 1999), cristais recém-formados emergiram 10 dias após o ferimento e no decorrer de 120 dias a regeneração não foi completada (Kadar et al. 2008). No mexilhão *Hyriopsis cumingii* (Lea, 1852), uma película fina e frágil se formou 6 dias após o dano e no dia 29, uma película marrom-avermelhada cobriu completamente a lacuna (Liu et al. 2018). Em *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1819) o aparecimento de uma película fina na concha foi observada apenas um dia após a indução da ferida, regenerando completamente depois de 5 a 10 (Yang et al. 2016; Liu et al. 2017).

Neste contexto, estudos sobre a regeneração de conchas em *Pomacea* foram realizados em *P. canaliculata*, no qual o tempo de cicatrização, crescimento e a sobrevivência foram avaliados (Yang et al. 2016; Liu et al. 2017). Entretanto, não se sabe como a concentração de cálcio dissolvida na água afeta a sobrevivência e crescimento das *Pomacea* no processo de regeneração. Dessa forma, o presente estudo avaliou a taxa de sobrevivência e o tempo de regeneração da concha em juvenis de *Pomacea dolioides* após incisões com formatos distintos e submetidos a diferentes concentrações de cálcio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efeito da concentração de cálcio na regeneração das conchas de *P. dolioides*

O experimento foi realizado em Junho e julho de 2019. Amostras de juvenis de *P. dolioides* foram coletadas manualmente e com auxílio de puçá no Bairro Mamud Amed (S 03°06'40,7", W 058°25'28,5") no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil (Figura 1). Os gastrópodes foram cuidadosamente colocados em caixas plásticas com água e aeração e transportados até o Laboratório de Zoologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (UFAM), onde foram mantidos em tanque circular de PVC com capacidade para 310 L, com sistema fechado de recirculação com renovação de água 180 L/h e filtro biológico externo. Eles foram alimentados com ração para peixe com 34% de proteína bruta sob iluminação natural por duas semanas antes do experimento.

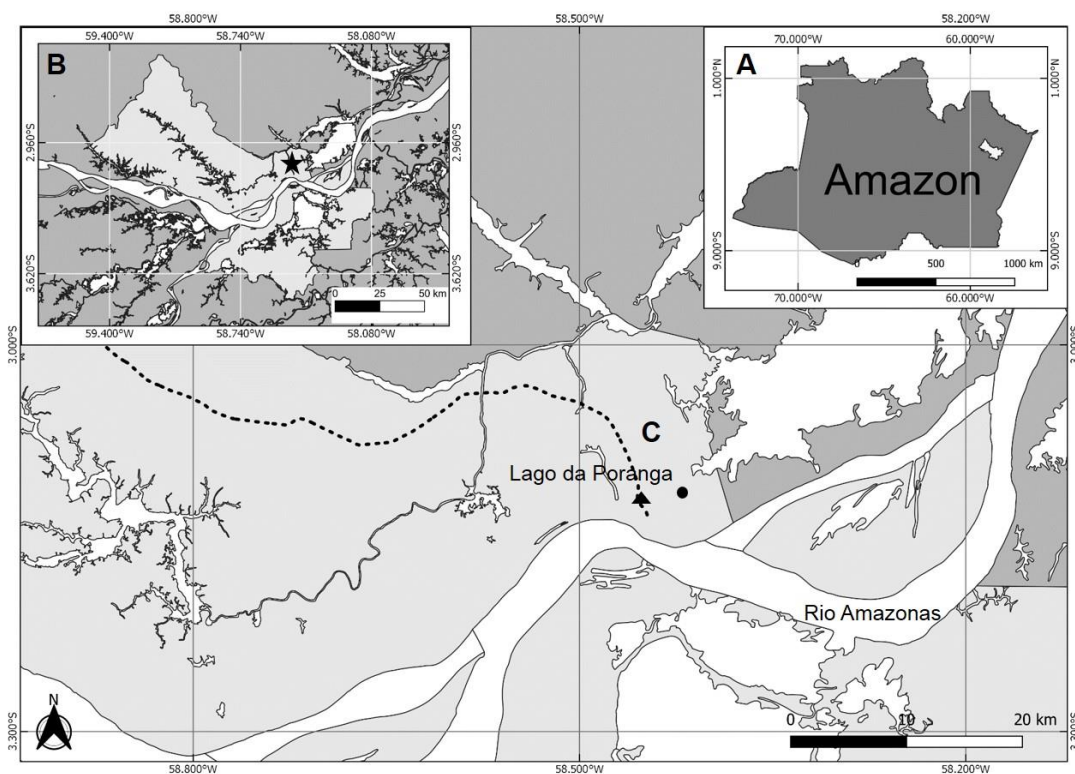


Figura 1- Localização geográfica dos locais de amostragem no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A: Amazônia, B: Itacoatiara, C: locais de amostragem. (●) Mamud Amed - coleta dos gastrópodes, (▲) Lago da Poranga - coleta de água.

Ao todo foram utilizados 180 juvenis de *P. dolioides* que foram cuidadosamente inspecionados quanto a morfologia da concha e somente indivíduos com concha perfeita foram utilizados no experimento. Em seguida, os gastrópodes foram medidos

quanto ao comprimento da concha com auxílio de paquímetro (0,05 mm). Na média apresentaram $24,05 \pm 0,62$ mm de comprimento da concha.

A água utilizada no experimento, foi uma mistura de sais de fundo feita com 300 L de água deionizada, 36 g de sulfato de magnésio, 57,6 g de bicarbonato de sódio e 2,4 g de cloreto de potássio de acordo com Glass & Darby (2009). O experimento foi realizado durante 60 dias, com seis tratamentos relacionados as concentrações sulfato de cálcio na água dos gastrópodes: 0 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L e 100 mg/L. Esses correspondem a concentrações de 0, 4,65, 9,31 13,97, 18,62 e 23,28 mg/L de cálcio, respectivamente. Para cada tratamento foram utilizadas três réplicas, compostas por três caixas (46 cm x 26 cm x 17 cm) com capacidade de 20 L.

Foi realizado um corte triangular (Figura 2 A) medindo 11 mm de base e 8 mm de lado na borda da abertura da concha em 90 caracóis no primeiro grupo experimental (Yang et al. 2016). No segundo grupo, foi feita uma incisão em forma de retângulo (Figura 3 A) medindo 4 mm x 8 mm partindo da borda da concha (Liu et al. 2017), com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Ambos os cortes apresentaram a mesma área (32 mm²). Cada grupo de 90 caracóis foi dividido em seis tratamentos com 15 indivíduos cada para indução da regeneração. Após os cortes, foram selecionados aleatoriamente 15 gastrópodes para cada tratamento em triplicata. Estes, foram marcados com esmalte de cores distintas, para o acompanhamento de cada indivíduo, e transferidos para caixas plásticas com 15 L de água com diferentes concentrações de cálcio e alimentados com ração para peixe com 34% de proteína. Além disso, registros fotográficos diários da concha regenerada foram obtidos utilizando uma câmera digital Canon Powershot SX530 HS.

Todas as caixas foram abastecidas com aeradores, mantendo a água oxigenada constantemente e a cada dois dias 25% da água foi renovada para retirada de excretas e restos de alimentos. A água utilizada para renovação continha a mesma mistura de sais de fundo supracitada, juntamente com a concentração de cálcio referente a cada tratamento. O experimento foi realizado sob condições naturais com ciclo de 12 h dia/noite e temperatura ambiente durante 10 dias. Após a regeneração completa da parte seccionada dos 15 caracóis de cada tratamento foi realizada uma segunda incisão e os gastrópodes foram mantidos na mesma concentração descrita acima até a regeneração completa da concha (Figura 2B e 3B).

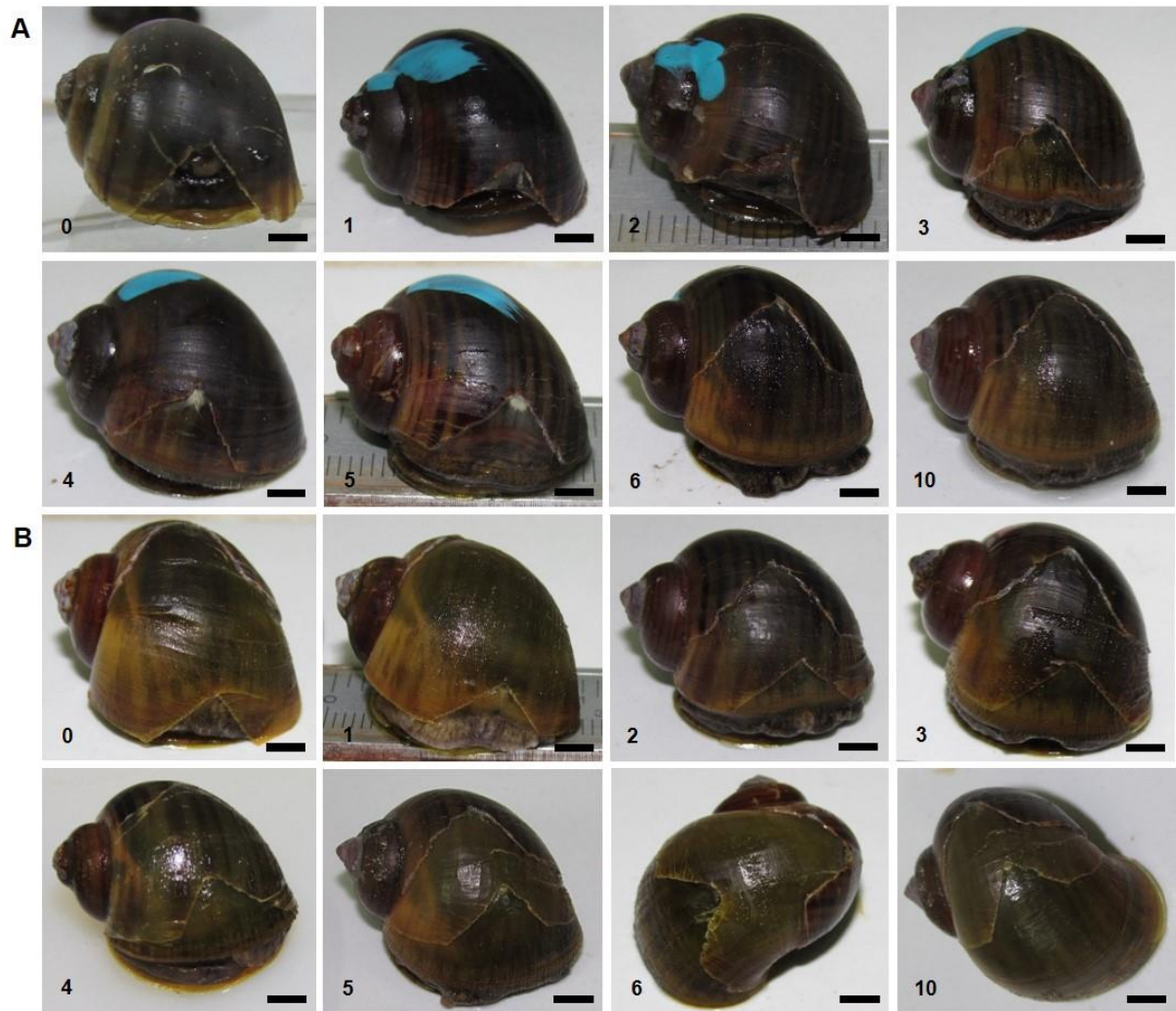


Figura 2. Imagens da regeneração da concha de *Pomacea dolioides* ao longo do experimento (10 dias) após a primeira (A) e segunda (B) incisões em forma de triângulo. Barra de escala= 0,5 cm.

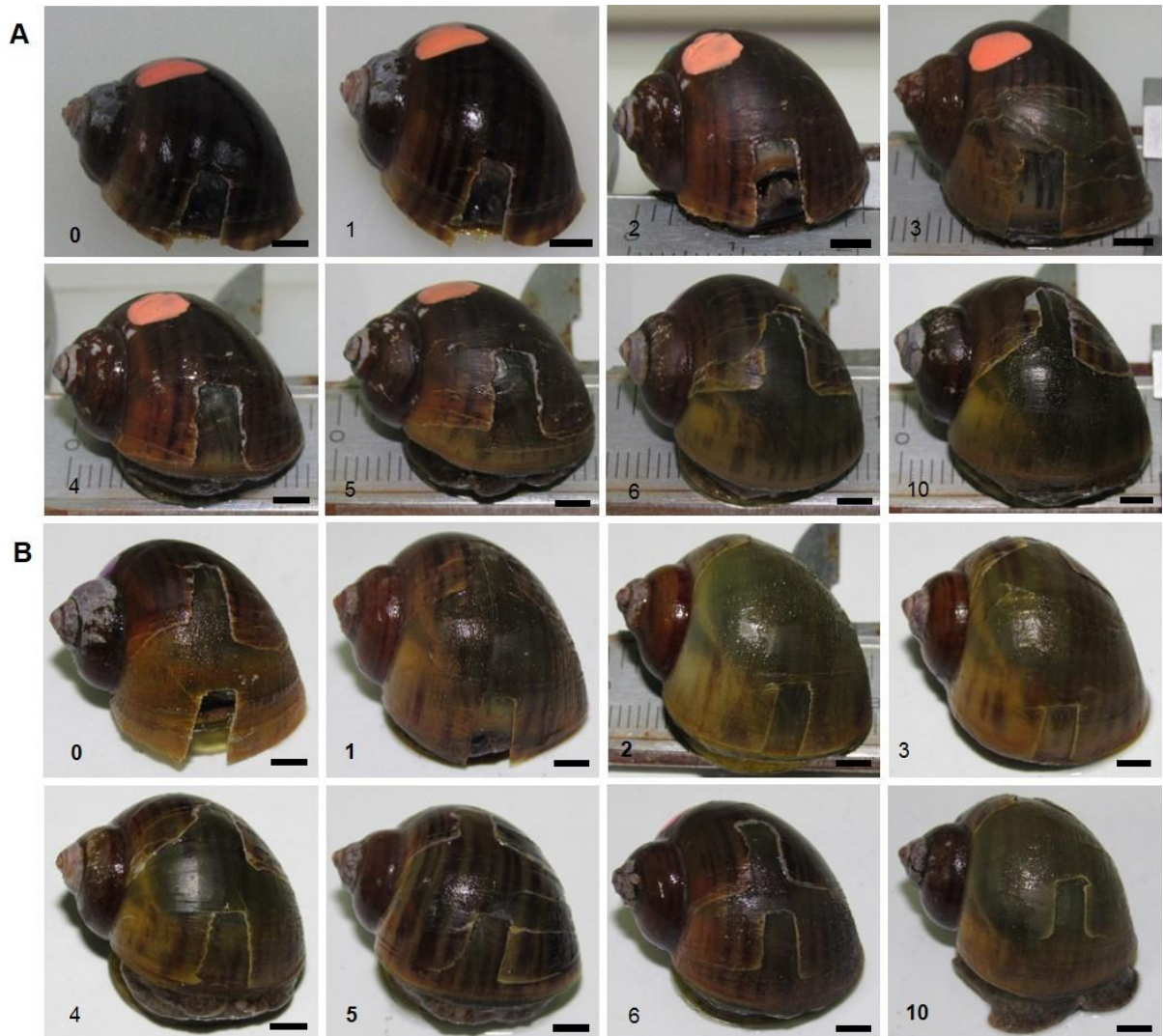


Figura 3. Imagens da regeneração da concha de *Pomacea dolioides* ao longo do experimento (10 dias) após a primeira (A) e segunda (B) incisões em forma de retângulo. Barra de escala= 0,5 cm.

Para comparação o mesmo experimento foi realizado com água do ambiente. Para este experimento foram utilizados 30 gastrópodes juvenis obtidos da mesma forma que no item 1 desta metodologia. A água utilizada foi coletada em um ambiente de várzea na Lagoa da Poranga (03°07'11,4" S, 58°27'13,0" W) (Figura 1), transportada para o Laboratório de Zoologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (UFAM) e transferida para uma caixa d'água com capacidade para 310 L com filtro biológico e aeração constante. Esta foi analisada pelo método titrimétrico EDTA do "Standard Methods" (Baird et al. 2017) para a determinação da concentração de cálcio, apresentando 3,3 mg/L de cálcio. Os gastrópodes foram divididos em dois grupos de 15 caracóis. No primeiro grupo foram feitas incisões em triângulo e no segundo incisões em forma de retângulo em triplicata. Para acompanhamento de cada

indivíduo os mesmos foram marcados com esmalte como descrito anteriormente. Os juvenis foram cultivados e analisados da mesma forma que no experimento anterior, para determinar a sobrevivência e tempo de regeneração dos gastrópodes.

2.1.1 Análise dos dados

A taxa de sobrevivência foi calculada pela fórmula: $TS = (N_f \times 100) / N_i$, onde TS = taxa de sobrevivência, N_f = número de gastrópodes final, N_i = número de gastrópodes inicial (Píres-Junior et al. 2019). Os dados de sobrevivência foram transformados em arco seno para atender os pressupostos ANOVA. A ANOVA fatorial foi utilizada para comparar a taxa de sobrevivência e o tempo de regeneração das conchas entre as concentrações de cálcio (seis tratamentos), tipos de corte (triangular ou quadrado) e induções (primeira e segunda). Para os dados do ambiente a ANOVA fatorial foi utilizada para comparar a taxa de sobrevivência e tempo de regeneração das conchas entre os tipos de corte (triangular e retangular) e induções (primeira e segunda). Para todas as análises foi adotado nível de significância $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

A regeneração das conchas de juvenis de *P. dolioides* iniciou desde o primeiro dia com o aparecimento de uma película fina. Esse reparo avançou gradualmente do ápice do triângulo e retângulo até a margem inferior da concha cortada. A taxa de sobrevivência dos gastrópodes foi em média $97,5 \pm 7,41 \%$, não apresentando diferença significativa entre os fatores concentrações de cálcio, corte (triângulo e retângulo) e indução com ($F(5,48) = 0,79273$, $P = 0,56022$) (Figura 4). No entanto, a sobrevivência foi significativa entre os dois tipos de corte e indução ($F(1,48) = 5,433$; $P = 0,02400$), no qual os gastrópodes apresentaram maior taxa sobrevivência com a incisão do tipo retângulo na segunda indução (Figura 5). A sobrevivência dos caracóis cultivados na água do ambiente foi de $95 \pm 12,43 \%$ e não apresentou diferença estatística entre o tipo de corte e o número de induções ($F(1,8) = 3,0$, $p = 0,12150$).

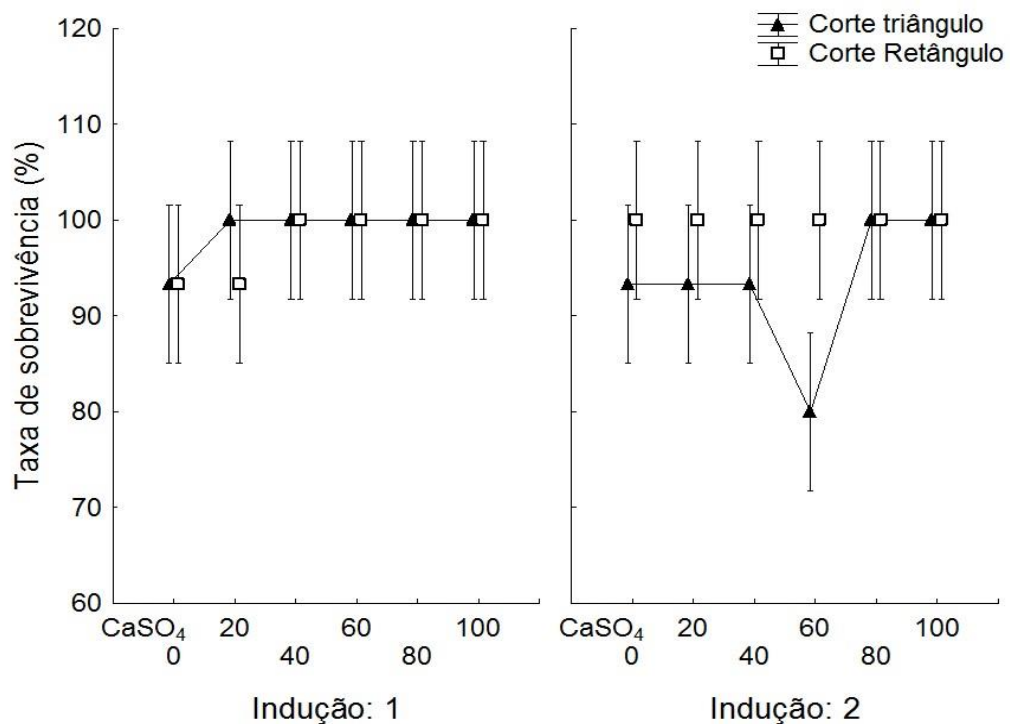


Figura 4. Taxa de sobrevivência do gastrópode *Pomacea dolioides* com relação as concentrações de CaSO₄, tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções.

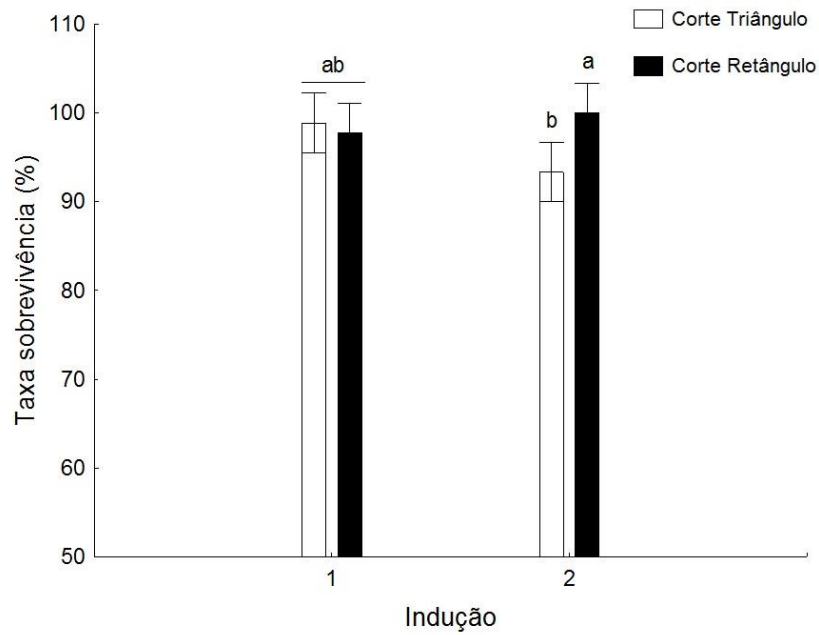


Figura 5. Taxa de sobrevivência do gastrópode *Pomacea dolioides* com relação ao tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey após a análise fatorial.

O tempo médio de regeneração da concha para os indivíduos submetidos a diferentes concentrações de sulfato de cálcio (0, 20, 40, 60, 80 e 100 mgL⁻¹), dois tipos de cortes (triângulo e retângulo) e duas induções foram de $3 \pm 1,2$ dias (Figura 2 e 3), não apresentando diferença significativa entre os fatores descritos ($F(5,318) = 0,542$, $p = 0,744672$) (Figura 6).

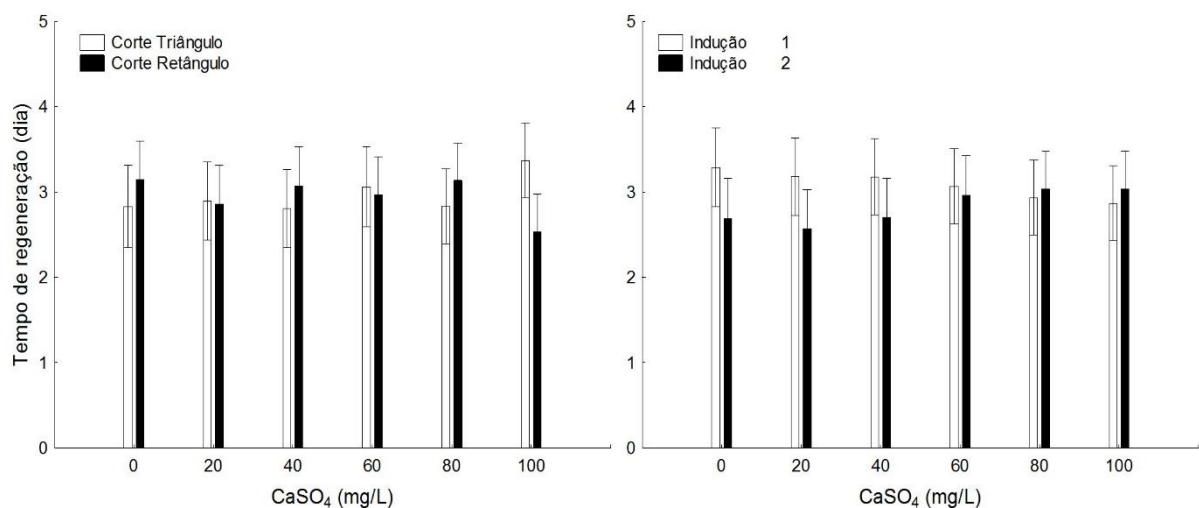


Figura 6. Tempo de regeneração do gastrópode *Pomacea dolioides* com relação as concentrações de sulfato de cálcio, tipo de corte e indução.

Para os gastrópodes regenerados na água do ambiente não houve diferença do tempo de regeneração em relação ao tipo de corte ($F(1,52) = 0,0038$, $P= 0,95$) (Figura 6). No entanto, a relação tempo e indução apresentou diferença significativa ($F(1, 52) = 70,451$, $P < 0,001$) (Figura 7). Na primeira indução, os caracóis levaram em média $2,73 \pm 1,11$ dias para regenerar a concha cortada e na segunda, $6,42 \pm 2,04$ dias. Além disso, a concha regenerada era sempre mais fina que a concha original. Após a regeneração completa da lacuna, é possível perceber uma cicatriz entre a concha original e a área regenerada (Figura 2 e 3). Após as induções da regeneração, a concha continuou crescendo aumentando gradualmente durante o período de regeneração. De modo geral, a incisão do tipo retângulo e primeira indução regeneraram mais rápido.

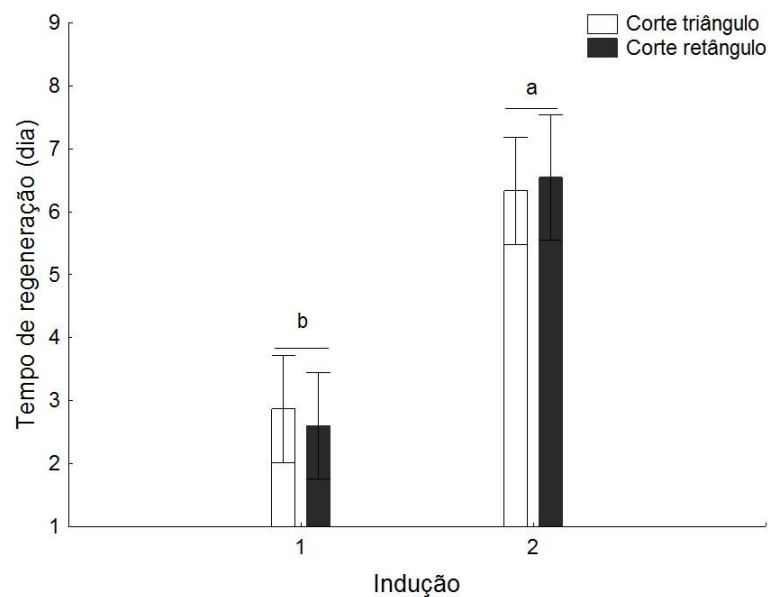


Figura 7. Tempo de regeneração dos gastrópodes *Pomacea dolioides* com água do ambiente em relação ao tipo de corte (triângulo e retângulo) e duas induções. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey após a análise fatorial.

De modo geral, o tipo de água (diferentes concentrações de cálcio e água do ambiente) e o tipo de corte (triângulo e retângulo) não influenciaram na taxa de sobrevivência e tempo de regeneração das conchas no gastrópode *P. dolioides* na primeira indução.

4. DISCUSSÃO

As taxas de sobrevivência do gastrópode *P. dolioides* submetidos à diferentes concentrações de cálcio e a água do ambiente no presente estudo, foi um pouco maior do que a sobrevivência encontrada por Liu et al. (2017) em juvenis de *P. canaliculata*, que foram de 92,31 e 96,15%, indicando que a *P. dolioides* tem a capacidade de sobreviver a pelo menos duas lesões consecutivas na concha. Além disso, nossos resultados demonstraram que a espécie tem capacidade de regenerar sua concha rapidamente, cobrindo a incisão em um período de 2 a 6 dias. De acordo com Yang et al. (2016), a retirada de um pedaço da concha faz com que o animal se retraia com a abertura fechada pelo opérculo, induzindo rapidamente a regeneração da concha. Esse início de regeneração é o resultado de uma resposta imune inespecífica relacionada à cicatrização de feridas (Kádár et al. 2008; Liu et al. 2013). O aparecimento de uma película fina no primeiro dia após a indução também foi relatado por Yang et al. (2016) em *P. canaliculata*, onde a característica morfológica mais notável, foi que a concha regenerada era extremamente fina para selar a lacuna o mais rápido possível.

O tempo de reparo das conchas de *P. dolioides* foi inferior à descrita em outros moluscos, visto que o tempo necessário para regenerar as conchas danificadas varia entre as espécies e os habitats dos moluscos (Kádár 2008; Kádár et al. 2008; Liu et al. 2013). Além disso, caracóis juvenis tem maior capacidade de regenerar as conchas feridas do que adultos (Liu et al. 2017). A regeneração do mexilhão azul *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) foi de 29 dias após a ferida (Huning et al. 2016). Liu et al. (2018) relataram um tempo de reparo de 29 dias para *Hyriopsis cumingii*. Estudos desenvolvidos em *P. canaliculata* revelaram uma regeneração em juvenis de 5 a 7 dias (Yang et al. 2016; Liu et al. 2017), já nos adultos regeneração das conchas ocorreu após 10 dias (Liu et al. 2017). Esses tempos de reparo da concha foram observados na primeira incisão.

É importante destacar ainda, que a concha continuou crescendo após a regeneração da área danificada, assim como na segunda indução, mesmo quando este crescimento era inferior a primeira. Liu et al. (2017), também observaram que a regeneração inicial e as múltiplas regenerações não diminuíram a capacidade de regeneração da concha. Esses mesmos autores relataram que múltiplas induções de

regeneração na concha de *P. canaliculata* aumentaram significativamente a área regenerada. De acordo com Yang et al. (2016), o crescimento da concha ocorre na borda distal, onde camadas minúsculas são adicionadas às camadas subjacentes. Como resultado, a concha cresce mais em comprimento do que em espessura (Marin 2004). Além disso, estrutura lamelar cruzada presente na concha de *P. dolioides* apresenta a propriedade de crescimento rápido e seus processos de reparo são mais rápidos que o nácar quando a casca é danificada (Liang et al. 2010).

No presente estudo, as concentrações de cálcio não influenciaram na taxa de sobrevivência e tempo de regeneração das conchas no gastrópode *P. dolioides* na primeira indução. Esses resultados podem estar relacionados a reserva de cálcio que provavelmente os gastrópodes já possuíam, uma vez que os juvenis foram coletados no ambiente e submetidos a diferentes concentrações de cálcio no laboratório. Ademais, a dureza e a estrutura cristalina da concha também podem ter influenciado na regeneração, uma vez que as conchas de *Pomacea* são finas e frágeis quando comparada com a concha dura de outros gastrópodes (Yang et al. 2016). Apresentando, assim, alta taxa de sobrevivência e tempo médio de 3 dias para regenerar as conchas.

Estudos desenvolvidos em outras espécies de moluscos comprovam que o processo de calcificação da concha depende dos íons de cálcio e bicarbonato. Estes, são absorvidos pela superfície do corpo do gastrópode e transportados através da hemolinfa para as células epiteliais, onde os cristais são sintetizados auxiliando no processo de regeneração (Mount et al. 2004; Kádár 2008).

Embora a concentração de cálcio na água não tenha interferido na regeneração das conchas do gastrópode *P. dolioides*, estudos relataram que diferentes concentrações de cálcio afetam a taxa de crescimento, espessura e o peso orgânico e inorgânico das conchas (Thomas et al. 1974; Madsen 1987; Brodersen & Madsen 2003). Li et al. 2016 ao estudarem a participação dos hemócitos na formação de cristais de carbonato de cálcio na regeneração da concha na ostra *Pinctada fucata* (Goud, 1850), observaram estruturas de cristais nos hemócitos compostos de cálcio, carbono, oxigênio, fósforo e silício, semelhante à do cristal CaCO_3 no ambiente circundante. Assim, a concentração de cálcio dissolvida no meio aquático é importante para a regeneração das conchas. O que não foi observado no presente estudo.

5. CONCLUSÃO

A partir desses resultados, podemos concluir que a concentração de cálcio não influenciou no processo de regeneração das conchas do gastrópode *P. dolioides*, sugerindo que a espécie utilizou sua reserva de cálcio para regenerar as áreas lesionadas em um tempo relativamente baixo. Como consequência, essa regeneração rápida pode prevenir infecções e predações, aumentando suas chances de sobrevivência e estabelecimento no ambiente.

6. REFERÊNCIAS

BARBOSA, A. H. S.; SILVA, C. S. P.; ARAÚJO, S. E.; LIMA, T. B. B.; DANTAS, I. M. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores da qualidade da água em um trecho do rio Apodi-Mossoró, **Holos**, ano 32, v. 7, 2016.

BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; RICE, E. W. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23 ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2017: Part 3000 Metals 3500-Ca.

BRODERSEN, J.; MADSEN, H. The effect of calcium concentration on the crushing resistance, weight and size of *Biomphalaria sudanica* (Gastropoda: Planorbidae). **Hydrobiologia**, v. 490, p. 181-186, 2003.

CADÉE G. C. Hydrobia as 'Jonah in the whale': shell repair after passing through the digestive tract of shelducks alive. **Palaios**, v. 26, p. 245–249, 2011.

CHATEIGNER, D.; HEDEGAARD, C.; WENK, H.-R. Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. **Journal of Structural Geology**, v. 22, p.1723-1735, 2000.

FLEURY, C.; MARIN, F.; MARIE, B.; LUQUET, G.; THOMAS, J.; JOSSE, C.; SERPENTINI, A.; LEBEL, J. M. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: a histological and microstructural study. **Tissue Cell**, v. 40, p. 207-218, 2008.

GLASS, N. H.; DARBY, P. C. The effect of calcium and pH on Florida apple snail, *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae), shell growth and crush weight **Aquatic Ecology**, v. 43, p. 1085-1093, 2009.

HAYES, K. A.; COWIE, R. H.; JORGENSEN, A.; SCHULTHEIß, R.; ALBRECHT, C.; THIENGO, S. C. Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. **American Malacological Bulletin**, v. 27, p. 47-58, 2009.

HÜNING, A. K.; LANGE, S. M.; RAMESH, K.; JACOB, D.E.; JACKSON, D. J.; PANKNIN, U.; GUTOWSKA, M. A.; PHILIPP, E. E. R.; ROSENSTIEL, P.; LUCASSEN, M.; MELZNER, F. A shell regeneration assay to identify biomineralization candidate genes in mytilid mussels. **Marine Genomics**, v. 27, p. 57-67, 2016.

KÁDÁR, E. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 362, p. 71–78, 2008.

KÁDÁR, E.; TSCHUSCHKE, I. G.; CHECA, A. Post-capture hyperbaric simulations to study the mechanism of shell regeneration of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 364, p. 80–90, 2008.

LI, S.; LIU, Y.; LIU, C.; HUANG, J.; ZHENG, G.; XIE, L.; ZHANG, R. Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 51, p. 263-270, 2016.

LIANG Y, ZHAO J, WU C. The micro/nanostructure characteristics and the mechanical properties of *Hemifusus tuba* Conch shell. **Journal of Bionic Engineering**, v. 7, p. 307-313, 2010.

LIU, Y.; BAI, Z.; LI, Q.; ZHAO, Y.; LI, J. Healing and regeneration of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* Lea after donating mantle saibos. **Aquaculture**, v. 392–395, p. 34-43, 2013.

LIU, L. L.; ZHAO, S.; YANG, J. E.; ZHANG, N. Q.; ZHAO, H.; WU, Z.; HE, T. M. Y.; GUO, J. Regeneration of excised shell by the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 11, n. 13, 2017.

LIU, A. X.; JINA, C., LID, H., BAIA, Z., LIA, J. Morphological structure of shell and expression patterns of five matrix protein genes during the shell regeneration process in *Hyriopsis cumingii*. **Aquaculture and Fisheries**, v. 3, p. 225–231, 2018.

LOWENSTAM, H. A. Minerals formed by organisms. **Science**, v. 211, p. 1126–1131, 1981.

MADSEN, H. Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). **Journal of Applied Ecology**, v. 24, p. 823-836, 1987.

MARSHALL, D. J.; DAY, R. Change in the rate of shell deposition and shell microstructure in response to shell borers in the abalone *Haliotis rubra*. **Marine Freshwater Behavior and Physiology**, v. 34, p. 189–195, 2001.

MARIN, F.; LUQUET, G. Molluscan shell proteins. **General Palaeontology (Palaeobiochemistry)**, v. 3, p. 469–492, 2004.

MOUNT, A. S.; WHEELER, A. P.; PARADKAR, R. P.; SNIDER, D. Haemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. **Science**, v. 304, p. 297–300, 2004.

MORRISON, A. E.; COCHRANE, E. E. Investigating shellfish deposition and landscape history at the Natia Beach site, Fiji. **Journal of Archaeological Science**, v. 35, p. 2387–2399, 2008.

PIMPÃO, D. M.; MARTINS, D. S. Moluscos de Água Doce do Tupé, Manaus, AM, Brasil. In: Santos-Silva, E.N., Scudeller, V.V. (Ed). **Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. Manaus, Editora UEA Ltda, 2009. v. 2, p. 63-70.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SIMONE, Luiz Rircardo Lopes. **Land and freshwater mollusks of Brazil**. São Paulo: EGB/FAPESP, 2006. 390 p.

TAKAHASHI, J.; TAKAGI, M.; OKIHANA, Y.; TAKEO, K.; UEDA, T.; TOUHATA, K MAEGAWA, S.; TOYOHARA, H. A novel silk-like shell matrix gene is expressed in the mantle edge of the Pacific oyster prior to shell regeneration. **Gene**, v. 499, p. 130–134, 2011.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; PIMPAO, D. M.; Diversity of Amazon Ampullariidae (Molusca; Caenogastropoda). In: Sant'Anna, B.S., Hattori, G.Y. (Ed). **Amazonian Apple Snails**. New York: Nova Science Publishers, 2017. p. 1-20.

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**, v. 43, n. 3, p. 839-860, 1974.

TRINKLER, N; JEAN-FRANÇOIS, B; FRÉDÉRIC, M; MAYLIS, L, JOLIVET A, PHILIPPE C, CHRISTINE P. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 93, p.149–162, 2011.

TRINKLER, N; SINQUIN, G; QUERNE, J; PAILLARD, C. Resistance to brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: a study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 8–16, 2010.

YANG, S.; NI, L.; ZHAO, L.; YANG, J.; LIU, Q.; ZHANG, J.; HE, Z.; PENG, S. Repair process and enzymatic activity associated with induction of shell regeneration in the invasive species. **Molluscan Research**, v. 36, p. 207–212, 2016.

YU, Z.; XIE, L.; LEE, S.; ZHANG, C. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 190-194, 2006.