

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E MONITORAMENTO AMBIENTAL

Natália Woppe

***Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) (Mollusca, Gastropoda) como uma espécie-modelo para ensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental de microplásticos em águas doces.**

Sorocaba
2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
E MONITORAMENTO AMBIENTAL

Natália Woppe

***Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) (Mollusca, Gastropoda) como uma espécie-modelo para ensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental de microplásticos em águas doces**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos.
Área de concentração: Biotecnologia Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman

Coorientação: Prof.^a Dr.^a Eliane Pintor de Arruda

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Sorocaba
2026

Woppe, Natália

Pomacea figulina (Spix in Wagner, 1827) (Mollusca, Gastropoda) como uma espécie-modelo para ensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental de microplásticos em águas doces / Natália Woppe -- 2026. 153f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Walter Ruggeri Waldman
Banca Examinadora: Monica Jones Costa, Emarielle Coelho Pardal
Bibliografia

1. Gastropoda. 2. Biomonitoramento. 3. Microplásticos. I. Woppe, Natália. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8
6979

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natália Woppe, realizada em 01/03/2026.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman (UFSCar)

Prof.^a. Dra. Monica Jones Costa (UFSCar)

Dra. Emarielle Coelho Pardal (UFMA)

Dedico este trabalho aos caramujos que tornaram possível a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTO

Às mulheres da minha família, pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão, fundamentais para a consolidação deste percurso acadêmico.

Aos meus amigos, Bruno, Laura, Guilherme, Bianca, Fabiano, Yasmin, Sandra, Raul, Enis e Bárbara, pela amizade e apoio em todo o processo e aos meus ex-alunos, pela experiência que me proporcionaram na escola pública e o apoio na minha decisão de migrar para área acadêmica.

Ao Grupo de Pesquisa em Poluição Plástica, pelo acolhimento e pelas contribuições científicas que enriqueceram este trabalho, e aos orientadores, Prof.^a Eliane Arruda e Prof. Walter Waldman, orientação e paciência.

Ao Sr. Betinho, pela disponibilidade e generosidade em autorizar a realização da coleta em sua propriedade, permitindo a execução de parte essencial desta investigação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro desta pesquisa, e ao Laboratórios de Fisiologia Animal e Comparada pela infraestrutura disponibilizada e suporte necessário à realização dos experimentos.

“A educação e o conhecimento é algo que ninguém jamais vai conseguir roubar da gente. E através da educação e do conhecimento que a gente pode contrapor a toda uma estrutura que nos quer deseducada.”

Erika Hilton

RESUMO

WOPPE, Natália. *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) (Mollusca, Gastropoda) como uma espécie-modelo de gastropoda para ensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental de microplásticos em águas doces, 2026. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2026.

Esta dissertação analisou a ocorrência e os efeitos de microplásticos no Mollusca gastropoda *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827), com o propósito de avaliar seu potencial como bioindicador em ambientes aquáticos. O trabalho foi organizado em uma introdução geral, três artigos e conclusões finais. No primeiro artigo, foi desenvolvido um protocolo para a criação da espécie em laboratório, testando diferentes dietas a fim de identificar as condições ideais de crescimento e sobrevivência, etapa essencial diante das dificuldades encontradas em águas com baixa dureza, que comprometem a integridade das conchas. Os resultados demonstraram que a combinação de ração com a couve foi o regime mais eficiente, enquanto a dieta composta exclusivamente couve resultou em elevada mortalidade. O segundo artigo caracterizou microplásticos presentes em exemplares coletados em um afluente (Rio Pirajibu-Mirim - 23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W) do rio Sorocaba, analisando cor, formato, tamanho, caracterização química e abundância dos particulados eliminados. Foram identificados fibras e fragmentos como predominantes, e constatou-se que a depuração não é linear, sugerindo retenção temporária no trato digestório. O terceiro artigo, consistiu em experimentos de exposição (72 h) controlada a microplásticos de polietileno em diferentes concentrações (10% e 20%), permitindo avaliar padrões de eliminação, possibilidade de bioacumulação. Em conjunto, os resultados demonstram que *P. figulina* apresentou características favoráveis ao biomonitoramento, como abundância regional, capacidade de ingestão de partículas plásticas e sensibilidade a ambientes impactados. A dissertação forneceu dados sobre a manutenção da espécie em condições laboratoriais e sobre os efeitos de microplásticos em moluscos de água doce, apresentando-a como um modelo promissor para estudos de poluição plástica em ecossistemas continentais.

Palavras-chave: Gastropoda; Ampullariidae; Biomonitoramento; Microplásticos.

ABSTRACT

This dissertation analyzed the occurrence and effects of microplastics in the gastropod mollusk *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827), to evaluate its potential as a bioindicator in aquatic environments. The work was organized into a general introduction, three articles, and conclusions. In the first article, a protocol for rearing the species in the laboratory was developed, testing different diets to identify the ideal conditions for growth and survival. This is an essential step, given the difficulties encountered in waters with low hardness, which compromise the integrity of the shells. The results demonstrated that the combination of feed with kale was the most efficient regime, while the diet composed exclusively of kale resulted in high mortality. The second article characterized microplastics present in specimens collected from a tributary (Rio Pirajibu-Mirim - 23°29'24.2" S; 47°23'06.3" W) of the Sorocaba River, analyzing the color, shape, size, chemical characterization, and abundance of the eliminated particulates. Fibers and fragments were identified as the predominant components, and it was found that clearance is not linear, suggesting temporary retention in the digestive tract. The third article consisted of controlled exposure experiments (72 h) to polyethylene microplastics at different concentrations (10% and 20%), allowing the evaluation of elimination patterns and the possibility of bioaccumulation. Taken together, the results demonstrate that *P. figulina* presented characteristics favorable to biomonitoring, such as regional abundance, capacity to ingest plastic particles, and sensibility to impacted environments. The dissertation provided data on the maintenance of the species under laboratory conditions and on the effects of microplastics on freshwater mollusks, presenting it as a promising model for studies of plastic pollution in continental ecosystems.

Keywords: Gastropoda; Ampullariidae; Biomonitoring; Microplastics.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
PRÓLOGO	13
1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Poluição plástica e micro(nano)plásticos	14
1.2 Bioindicadores e Macroinvertebrados bentônicos	15
1.3 Gastrópodes.....	16
1.4 <i>Pomacea figulina</i> (Spix in Wagner, 1827).....	17
2. REFERÊNCIAS	18
3.CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1	22
Introduction	23
Methodology.....	25
Field Sampling and Pre-Experimental Maintenance of Organisms.....	25
Development and preparation of experimental diets.....	26
Experimental Setup and Execution	27
Morphometric and Mortality Analysis	28
Analysis of toxic ammonia.....	29
Calculation of weekly growth percentage.....	29
Statistical Analyses	30
Results	30
Discussion.....	34
Conclusion.....	38
List of Abbreviations.....	39
Supplementary Information.....	39
Acknowledgements	39
Author contributions.....	39
Funding.....	39
Data availability.....	39
Declarations.....	39
Ethics approval and consent to participate	39
Consent for publication	40
Competing interests	40

References	40
4. CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2	45
RESUMO.....	45
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.2.1 Coleta e Transporte dos indivíduos.....	46
4.2.2 Aclimação e Condições Experimentais	47
4.2.3 Experimentação.....	47
4.2.4 Filtragem, análise morfológica e cromática	48
4.2.5 Caracterização química	48
4.2.6 Controle de qualidade (branco).....	48
4.2.7 Análise Estatística	49
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.3.1 Cinética de depuração	49
4.3.2 Morfologia e cores dos particulados	50
4.3.3 Distribuição de tamanho das fibras e fragmentos	54
4.3.5 Composição química dos particulados.....	57
4.4 CONCLUSÕES	59
4.6 REFERÊNCIAS	59
5. CAPÍTULO 4 - ARTIGO 3	62
RESUMO.....	62
5.1 INTRODUÇÃO.....	63
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
5.3.1 Coleta e Transporte	64
5.3.2 Aclimação e grupos experimentais.....	64
5.3.3 Depuração pré-exposição	64
5.3.4 Caracterização dos microplásticos de polietileno	64
5.3.5 Exposição	64
5.3.6 Depuração pós-exposição.....	65
5.3.7 Contabilização dos microplásticos	65
5.3.8 Eutanásia e processamento dos órgãos.....	66
5.3.9 Análise Estatística	67
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
5.4.1 Caracterização do polietileno ofertado.....	67

5.4.2 Quantidade de microplásticos	68
5.4.3 Tamanho dos microplásticos	72
5.4.4 Microplásticos nos órgãos	73
5.5 CONCLUSÕES	76
5.6 REFERÊNCIAS	77
6. CONCLUSÃO GERAL	79
8. ANEXO – A (Artigo 1 – Versão em português)	81
9. ANEXO – B (Material Suplementar – Artigo 1).....	97
9. ANEXO – C (Material Suplementar – Artigo 3).....	140

PRÓLOGO

Esta dissertação está organizada em uma estrutura de uma introdução geral, precedidos de três artigos e finalizado por uma conclusão geral.

A pesquisa visa investigar a ocorrência e os efeitos de microplásticos em *Pomacea figulina*, um gastrópode de importância ecológica para a região de Sorocaba, além de avaliar seu potencial como bioindicador de poluição em ambientes aquáticos.

A introdução geral apresenta uma contextualização sobre o organismo em estudo, abordando sua utilização em pesquisas, relevância ecológica e aplicações em monitoramento ambiental. Também é apresentado o conhecimento atual na literatura sobre microplásticos.

O Artigo 1, desenvolvido em colaboração com o grupo (Febriana Marcela Amaral Tefa, Glaucia Isabel de Andrade Sebastião, Bruna Natalina de Souza Martins, Mussa Issufo, Sandra Leticia Silva dos Santos, Luciano Cadaval Basso, Eliane Pintor de Arruda), detalha um protocolo para a manutenção de *Pomacea figulina* em condições laboratoriais. Este trabalho é de extrema importância, pois enfrentamos desafios em manter moluscos na UFSCar - Sorocaba, devido à deficiência de magnésio e cálcio na água da universidade, o que acelera a desintegração da concha dos animais e pode levar ao óbito. O objetivo principal deste artigo é garantir a sobrevivência desses organismos para que possam ser utilizados em futuros bioensaios.

O Artigo 2 consiste na caracterização dos microplásticos presentes em *Pomacea figulina* capturados em um afluente urbano de Sorocaba, que deságua no rio principal da cidade. Foram analisadas as cores, formas, tamanho, abundância e composição dos materiais particulados encontrados nas fezes dos organismos, fornecendo dados sobre a contaminação do ambiente por esses poluentes.

O Artigo 3 explora a capacidade dessa espécie como bioindicadora de microplásticos. Para isso, foram realizados experimentos de exposição controlada a diferentes concentrações de microplásticos de polietileno (derivados de sacolas plásticas), avaliando o tempo de residência no indivíduo, possível bioacumulação e possíveis efeitos fisiológicos.

Esta estrutura foi delineada para garantir uma abordagem sistemática, permitindo que cada etapa contribua para uma compreensão abrangente do tema, desde a manutenção do organismo em laboratório até sua aplicação em estudos ecotoxicológicos.

1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Poluição plástica e micro(nano)plásticos

A produção de plásticos em larga escala é um problema ambiental que está relacionado ao consumo e descarte de objetos que possuem polímeros em sua composição (Gaylarde; Baptista-Neto; Da Fonseca, 2021). Desde a década de 1950, a produção mundial de plásticos ultrapassou bilhões de toneladas e, uma parcela significativa não recebe a destinação ambientalmente adequada. São encontradas partículas de plásticos no ar, solo, água e em toda biota (terrestre e aquática) (Geyer; Jambeck; Law, 2017). A maioria desses detritos estão acumulados nos ecossistemas aquáticos, podendo chegar a tamanhos invisíveis a olho nu, facilitando o processo de contaminação (Bugatti et al., 2023a). A problemática agrava-se devido a fragmentação dos plásticos em microplásticos e nanoplásticos, apresentando mobilidade ambiental e potencial de interação biológica.

Microplásticos (MPs), com até 5 mm de tamanho, e nanoplásticos (NPs), menores que 1 µm, são pequenas partículas de polímeros originadas de duas formas: primária ou secundária. Os micro(nano)plásticos primários são produzidos intencionalmente para uso em produtos como cosméticos e tecidos sintéticos (P. Olivatto et al., 2018). Já os micro(nano)plásticos secundários resultam da fragmentação de plásticos maiores por processos naturais físicos e químicos, ou pela digestão de animais como macroinvertebrados (Rodrigues; Salla; Rocha, 2023a). Essas partículas já foram encontradas em sedimentos, organismos marinhos, água doce e tecidos humanos (Koelmans, 2015).

O impacto dos microplásticos e nanoplásticos na saúde ambiental está relacionada por ser um contaminante emergente, tornando-se vetores nas interações tróficas. Os organismos localizados na base da cadeia alimentar, como moluscos, crustáceos, zooplânctons, acabam a ingerir microfragmentos de plásticos devido à sua semelhança com partículas alimentares naturais; a ingestão destes particulados pode provocar obstrução intestinal, diminuição do crescimento, alterar a capacidade alimentar e reprodutiva (Wright; Kelly, 2017). Por estarem na base da cadeia alimentar, podem tornar vetores de poluição plástica para os outros níveis tróficos (Cole et al., 2013; Setälä; Fleming-Lehtinen; Lehtiniemi, 2014).

Nos seres humanos, a principal forma de exposição ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Foram detectados MPs na placenta, sangue, cérebro e outros órgãos (Cox et al., 2019; Fournier et al., 2021). Estudos já identificaram microplásticos e nanoplásticos em bivalves, crustáceos, água potável, mel e sal de cozinha (Waring; Harris; Mitchell, 2018).

Após a ingestão, partículas maiores tendem a ser eliminadas, mas os nanoplásticos podem atravessar barreiras epiteliais, causando danos celulares, respostas inflamatórias ou bioacumulação (Bugatti et al., 2023b). Pesquisas experimentais sugerem que essas partículas podem alcançar a circulação sanguínea e se depositar em órgãos.

A maioria dos polímeros plásticos recebe aditivos como plastificantes, retardantes de chama, pigmentos e metais para aprimorar suas aplicações (Andrady, 2011; Rodrigues; Salla; Rocha, 2023a). Expostos ao intemperismo, estes polímeros fragmentam-se em partículas menores e liberam aditivos via lixiviação (Mortula et al., 2021). Sua superfície hidrofóbica facilita a adsorção de contaminantes orgânicos persistentes e metais (Rochman et al., 2019). Por isso, plásticos são considerados contaminantes emergentes, podendo ser ingeridos e causar efeitos subletais, bioacumulação e maior toxicidade à biota.

Diante disso, observa-se que os microplásticos e nanoplásticos representam um risco à saúde humana, principalmente por existirem lacunas e limitações para compreensão dos diversos mecanismos de toxicidade. Essas partículas apresentam uma capacidade de interagir com sistemas biológicos, especialmente na escala nanométrica. Além disso, a presença de aditivos e co-poluentes pode intensificar a toxicidade, aumentando os riscos associados à exposição. Embora haja lacunas e limitações sobre efeitos da exposição a longo prazo, a literatura aponta serem necessárias estratégias preventivas, sobretudo ao controle da poluição plástica em escala global.

1.2 Bioindicadores e Macroinvertebrados bentônicos

Organismos bioindicadores são espécies ou grupos de espécies que podem refletir os níveis de contaminação biótica ou abiótica de uma área, gerando informações sobre a qualidade ambiental (Novais; Macioszek, 2021). Invertebrados bentônicos são bons bioindicadores, pois geralmente apresentam sensibilidade à exposição e ingestão de poluentes, gerando informações biológicas que servem como uma ferramenta de análise para verificar a qualidade da água e a saúde do ecossistema (Barbosa et al., 2016). Em outras situações, a sobrevivência dos indivíduos pode ficar comprometida quando ocorre o acúmulo de substâncias acima do normal, levando a alterações na densidade populacional, que funciona como um marcador biológico. Esta maior sensibilidade está relacionada com sua íntima associação com o substrato, pelo fato de serem fixos ou sésseis e por terem ciclos de vida curtos, e, portanto, refletindo a contaminação local.

Os macroinvertebrados bentônicos são animais aquáticos que vivem associados a algum tipo de substrato, como, por exemplo, costões rochosos, raízes de plantas, fundo de ambientes como embaixo de pedras, sedimentos, lama e areia. Localizados nos substratos, muitos realizam a decomposição de matéria orgânica, participando do fluxo de energia e integrando a cadeia alimentar. Algumas espécies bentônicas estão associadas às trocas de materiais nos sedimentos ou em colunas d'água. Esta gama de invertebrados pode ser utilizada como bioindicadores (Queiroz et al., 2018).

1.3 Gastrópodes

Os gastrópodes representam cerca de 80% dos moluscos, com muitos habitando ambientes aquáticos, inclusive de água doce (Rodrigues; Salla; Rocha, 2023b). A sua vasta dispersão geográfica, significativa flexibilidade ecológica e aptidão para a adaptação tornam esses organismos componentes cruciais nas cadeias tróficas, desempenhando funções como consumidores primários e detritívoros, essenciais para a ciclagem de nutrientes e o fluxo de energia.

Apesar disso, esses organismos ainda são pouco empregados como bioindicadores em função da ausência de protocolos padronizados. No entanto, pesquisas apontam que os macroinvertebrados bentônicos apresentam grande potencial para indicar a saúde de ecossistemas aquáticos, possibilitando a avaliação da qualidade da água e dos sedimentos quanto à presença de substâncias orgânicas e inorgânicas (Tallarico; Miyasato; Nakano, 2016). Sua baixa mobilidade e o contato direto com os substratos favorecem a detecção de contaminações locais, refletindo de maneira integrada as condições ambientais (Callisto, 2005).

Ademais, apresentam estruturas especializadas que podem potencializar sua aplicação em estudos toxicológicos, como a rádula, responsável pela raspagem do alimento, que facilita a ingestão de partículas presentes nos sedimentos e/ou biofilmes que podem estar associados a contaminantes. O pé muscular interage diretamente com o substrato, promovendo uma ampliação da exposição. Ademais, há estudos que destacam a glândula digestiva, um órgão relacionado à digestão, absorção e biotransformação de xenobióticos (Barbosa, 1995; Tamburi; Martín, 2009; Hayes et al., 2015).

No contexto de poluição plástica, os gastrópodes se destacam em estudos toxicológicos, ao mostrarem que a presença de MPs e NPs nos caracóis pode ser transferida ao longo da cadeia alimentar (Chae; An, 2020). A sua ampla dispersão e a representação de 80% do filo Mollusca

reforçam o uso destes organismos. Além do mais, por conta de sua significativa biomassa, capacidade adaptativa, dispersão geográfica, desempenham papel fundamental na dinâmica das cadeias tróficas, atuando como vetores desses contaminantes (Prime-Habdija; Habdija; Radanović, 1998).

1.4 *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827)

O gênero *Pomacea* engloba gastrópodes dulcícolas pertencentes à família Ampullariidae, amplamente distribuídos nos ambientes neotropicais no Brasil, com registros predominantes nas regiões Nordeste, Sudeste, Norte e litoral (Barbosa, 1995). As espécies são conhecidas popularmente como aruá, caramujo-do-banhado ou caracol-maçã. Em algumas culturas, são utilizadas como alimento e espécies exóticas de *Pomacea* são comercializadas para fins de aquarismo (Costa Neto et al., 2019). Trata-se de um molusco adaptado a ambientes de água doce, como rios, lagos e reservatórios, com a capacidade de tolerar variações físico-químicas do meio aquático (Barbosa, 1995; Mardones et al., 2021).

A *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) apresenta respiração anfíbia, característica dos ampularídeos. Esta capacidade ocorre por possuir a presença simultânea de brânquias, responsáveis pela respiração aquática, e de um pulmão que permite a captação de oxigênio aéreo. Este mecanismo apresenta uma vantagem adaptativa em ambientes com flutuações na concentração de oxigênio dissolvido, possibilitando sua sobrevivência e resistência em corpos d'água. Também se destaca por sua interação constante com sedimentos e biofilmes, devido ao seu hábito alimentar predominante, raspador e detritívoro. Essas características favorecem a ingestão de partículas suspensas e depositadas no substrato.

Estudos relacionados à família Ampullariidae revelam que espécies do gênero *Pomacea* podem acumular metais e outros poluentes orgânicos nos tecidos da glândula digestiva. Essas capacidades podem ser identificadas a partir de análises de alterações histopatológicas, modificações em biomarcadores enzimáticos e também por meio das mudanças nos parâmetros de crescimento e reprodução (Kruatrachue et al., 2011; Vega et al., 2012; Arrighetti et al., 2018; Campoy-Diaz et al., 2018, 2020; Yap et al., 2023; Khamboonruang et al., 2024).

Na represa de Itupararanga, importante manancial de abastecimento de água na região de Sorocaba, *P. figulina* apresenta uma abundância expressiva que reforça sua aplicabilidade como espécie bioindicadora (Vendramini; Arruda, 2022). A análise desses organismos pode fornecer informações relevantes sobre a presença e composição de poluentes no corpo hídrico, incluindo a identificação e quantificação de polímeros.

A *Pomacea figulina* reúne características ecológicas, fisiológicas e morfológicas que a tornam modelo adequado para estudos em biomonitoramento em ambientes de água doce, principalmente em reservatório destinado a abastecimento público, onde a avaliação da contaminação possui implicações para saúde ambiental e segurança hídrica.

2. REFERÊNCIAS

ANDRADY, Anthony L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596–1605, ago. 2011.

ARRIGHETTI, F. *et al.* Differential response between histological and biochemical biomarkers in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gasteropoda: Ampullariidae) exposed to cypermethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 140–151, jan. 2018.

BARBOSA, Antônio Helton Da Silva *et al.* MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DA ÁGUA EM UM TRECHO DO RIO APODI-MOSSORÓ. **HOLOS**, v. 7, p. 121–132, 12 nov. 2016.

BARBOSA, Frederico Simões. **Tópicos em Malacologia Médica**. [S.l.]: Editora FIOCRUZ, 1995.

BUGATTI, Cauê *et al.* Microplásticos e Nanoplásticos e sua relevância na saúde humana: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e6712139302, 1 jan. 2023a.

BUGATTI, Cauê *et al.* Microplásticos e Nanoplásticos e sua relevância na saúde humana: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e6712139302, 1 jan. 2023b.

CALLISTO, Marcos. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. [S.d.].

CAMPOY-DIAZ, Alejandra D. *et al.* Bioindication of mercury, arsenic and uranium in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Bioconcentration and depuration in tissues and symbiotic corpuscles. **Chemosphere**, v. 196, p. 196–205, abr. 2018.

CAMPOY-DIAZ, Alejandra D. *et al.* A freshwater symbiosis as sensitive bioindicator of cadmium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 3, p. 2580–2587, jan. 2020.

CHAE, Yooeun; AN, Youn-Joo. Effects of food presence on microplastic ingestion and egestion in *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, v. 240, p. 124855, fev. 2020.

COLE, Matthew *et al.* Microplastic Ingestion by Zooplankton. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 12, p. 6646–6655, 18 jun. 2013.

COSTA NETO, Eraldo Medeiros *et al.* DIAGNÓSTICO ETNOECOLÓGICO EM COMUNIDADES PESQUEIRAS DO MUNICÍPIO DE CONDE, REGIÃO LITORAL NORTE DO ESTADO DA BAHIA. **Ethnoscience**, v. 4, n. 1, 25 out. 2019.

COX, Kieran D. *et al.* Human Consumption of Microplastics. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 12, p. 7068–7074, 18 jun. 2019.

FOURNIER, Elora *et al.* Microplastics in the human digestive environment: A focus on the potential and challenges facing in vitro gut model development. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, p. 125632, ago. 2021.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 7 jul. 2017.

HAYES, Kenneth A. *et al.* Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 58, n. 1–2, p. 245–302, abr. 2015.

JEYAVANI, Jeyaraj *et al.* Dietary consumption of polypropylene microplastics alter the biochemical parameters and histological response in freshwater benthic mollusc *Pomacea paludosa*. **Environmental Research**, v. 212, p. 113370, set. 2022.

KHAMBOONRUANG, Pattrawan *et al.* Microplastic accumulation in the golden apple snail *Pomacea canaliculata* serves as a bioindicator in the urban lowlands of Nakhon Pathom Province, central Thailand. **Ecologica Montenegrina**, v. 80, p. 46–61, 30 nov. 2024.

KOELMANS, Albert A. Modeling the Role of Microplastics in Bioaccumulation of Organic Chemicals to Marine Aquatic Organisms. A Critical Review. *In*: BERGMANN, Melanie; GUTOW, Lars; KLAGES, Michael (Orgs.). **Marine Anthropogenic Litter**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 309–324.

KRUATRACHUE, M. *et al.* Histopathological Effects of Contaminated Sediments on Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 6, p. 610–614, jun. 2011.

MARDONES, Maria L. *et al.* Parents living in water, embryos developing in air: respiratory adaptations to use both environments in the freshwater gastropod *Pomacea figulina* (Gastropoda, Ampullariidae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 87, n. 3, p. eyab030, 16 set. 2021.

MORTULA, Md Maruf *et al.* Leachability of microplastic from different plastic materials. **Journal of Environmental Management**, v. 294, p. 112995, set. 2021.

NOVAIS, William Douglas Lacerda; MACIOSZEK, Patrick Franciulli. Identificação de Gastrópodes límnicos em reservatórios utilizados para abastecimento público: importância para segurança hídrica / Identification of limnic gastropods in reservoirs used for public supply: importance for water security. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 4, p. 4877–4883, 4 out. 2021.

P. OLIVATTO, Glauca *et al.* Microplastics: Contaminants of Global Concern in the Anthropocene. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 6, p. 1968–1989, 2018.

PRIMC-HABDIJA, Biserka; HABDIJA, Ivan; RADANOVIĆ, Ines. Seasonal changes in trophic structure of periphytic ciliates in relation to discharge regime. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 26, n. 3, p. 1116–1119, mar. 1998.

QUEIROZ, Maria Elisa Ferreira De *et al.* Utilização de macroinvertebrados bêntônicos como bioindicadores em córrego urbano de Conceição do Araguaia-PA. **Sustentabilidade em Debate**, v. 9, n. 3, p. 96–110, 28 dez. 2018.

ROCHMAN, Chelsea M. *et al.* Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703–711, 1 abr. 2019.

RODRIGUES, Cândido Carvalho; SALLA, Raquel Fernanda; ROCHA, Thiago Lopes. Bioaccumulation and ecotoxicological impact of micro(nano)plastics in aquatic and land snails: Historical review, current research and emerging trends. **Journal of Hazardous Materials**, v. 444, p. 130382, fev. 2023a.

RODRIGUES, Cândido Carvalho; SALLA, Raquel Fernanda; ROCHA, Thiago Lopes. Bioaccumulation and ecotoxicological impact of micro(nano)plastics in aquatic and land snails: Historical review, current research and emerging trends. **Journal of Hazardous Materials**, v. 444, p. 130382, fev. 2023b.

SETÄLÄ, Outi; FLEMING-LEHTINEN, Vivi; LEHTINIEMI, Maiju. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 77–83, fev. 2014.

TALLARICO, Lenita de Freitas; MIYASATO, Patrícia Aoki; NAKANO, Eliana. Rearing and Maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and Embryos under Laboratory Conditions. 2016.

TAMBURI, Nicolás E.; MARTÍN, Pablo R. Feeding Rates and Food Conversion Efficiencies in the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 51, n. 2, p. 221–232, ago. 2009.

VEGA, Israel A. *et al.* Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3307–3316, set. 2012.

VENDRAMINI, Bianca Medeiros; DE ARRUDA, Eliane Pintor. Freshwater mollusk species of Ituparanga Reservoir, São Paulo, Brazil. [*S.d.*].

WARING, R. H.; HARRIS, R. M.; MITCHELL, S. C. Plastic contamination of the food chain: A threat to human health? **Maturitas**, v. 115, p. 64–68, set. 2018.

WRIGHT, Stephanie L.; KELLY, Frank J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 6634–6647, 20 jun. 2017.

XIE, Wenwen *et al.* Dynamic fate of polystyrene microplastics in terrestrial snails through dietary exposure: accumulation, excretion, and molecular impacts. **Environment International**, v. 210, p. 110214, abr. 2026.

YAP, Chee Kong *et al.* Heavy Metal Exposures on Freshwater Snail *Pomacea insularum*: Understanding Its Biomonitoring Potentials. **Applied Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1042, 12 jan. 2023.

3.CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1

Development of a nutritional protocol for laboratory rearing of *Pomacea figulina* (SPIX IN WAGNER, 1827)

Submitted: January 14, 2026. – The Journal of Basic and Applied Zoology (Springer Nature)

Submission ID: bd4ef182-0f83-4714-bc74-aa4506820cf5

Authors: Natalia Woppe^{1,3}, Febriana M. A. Tefa¹, Sandra L. S. Santos¹, Glaucia I. A. Sebastião², Bruna N. S. Martins¹, Mussa Issufo^{1,4}, Luciano C. Basso³, Eliane P. Arruda³

¹ Postgraduate Program in Biotechnology and Environmental Monitoring (PPGBMA), Center for Science and Technology (CCTS), Federal University of São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brazil.

² Postgraduate Program in Planning and Use of Renewable Resources (PPGPUR), Center for Science and Technology (CCTS), Federal University of São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brazil.

³ Center for Human and Biological Sciences (CCHB), Federal University of São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brazil.

⁴ Institute of Rural Development and Biosciences (ISDRB), Rovuma University, Niassa, Mozambique.

Correspondent author: E.P. de Arruda; arruda@ufscar.br

Abstract

Background

Pomacea figulina is a neotropical freshwater gastropod that has emerged as a promising native biomonitor due to its ecological characteristics and sensitivity to environmental contaminants. However, the lack of standardized laboratory rearing protocols limits its use in ecotoxicological bioassays and environmental monitoring. This study aimed to establish a controlled laboratory culture protocol for *P. figulina*, with emphasis on survival and growth performance, to support its future application in ecotoxicological research.

Results

Egg masses were collected in Sorocaba, São Paulo, Brazil, and incubated under controlled conditions for 20 days. After hatching, 120 individuals were randomly distributed among 40 aquariums and maintained for 10 weeks at constant temperature and aeration. Four dietary treatments were tested: (1) commercial fish food, (2) fresh kale, (3) a mixture of fish food and kale, and (4) laboratory-produced diet composed of fish food, eggshells, agar, and water. Individuals fed the laboratory-produced diet exhibited the best biological performance, characterized by the lowest mortality rate and the highest average gains in body mass and shell length. The mixed diet and the kale-only diet showed intermediate and similar developmental patterns, with gradual growth and relatively stable survival. The fish food-only diet resulted in modest but continuous growth and an intermediate mortality rate. Overall, diet was identified as a key factor influencing growth and survival, although water quality and characteristics of the egg clutches may also have contributed to the observed variation among treatments.

Conclusions

Nutritional composition plays a decisive role in the success of laboratory rearing of *P.figulina*. The use of a calcium-supplemented laboratory diet provides a reliable foundation for maintaining this species under controlled conditions. These findings reinforce the suitability of *P.figulina* as a model organism for ecotoxicological bioassays and environmental biomonitoring, contributing to the development of standardized methodologies for Neotropical freshwater mollusks.

Keywords: growth performance, husbandry techniques, feeding protocol, freshwater snails, Ampullariidae, Mollusca.

Introduction

Pomacea figulina (Spix in Wagner, 1827) is a species of freshwater gastropod belonging to the family Ampullariidae. The species occurs in Brazil with a coastal distribution, from the Northeast to the Southeast of the country (Silvana C. Thiengo, personal communication), and was first reported in the Sorocaba River Basin in the state of São Paulo by Rodrigues et al. (2016). Although other species within the same genus, such as *Pomacea canaliculata* and

Pomacea scalaris, are recognized as invasive (Wu et al., 2011; Hayes et al., 2015), *P. figulina* has not, to date, been reported outside its native range. Reproduction in its habitats occurs between September and March, and oviposition takes place above the water level. The eggs have a pink coloration, turning grayish as hatching approaches, after approximately 15 days (Thiengo et al., 2011). They feed primarily on aquatic vegetation but are considered generalists, as they exhibit necrophagous habits and also consume living organisms present in the benthos (Thiengo et al., 2011).

Aquatic environments can become contaminated by pollutants from various sources, whether from agricultural or mining activities, as well as domestic or industrial sources. Organisms inhabiting these environments are exposed to xenobiotics such as insecticides and pesticides, which are foreign substances to their bodies. However, in some cases exposure to xenobiotics can induce changes in these organisms, as seen in female Caenogastropoda, which may exhibit alterations in their reproductive system due to a phenomenon called imposex, triggered by the presence of endocrine disruptors in the environment (Fernandez, 2011; Huaquín, Lorena & Osorio, 2011).

The quality of an aquatic environment can thus be inferred by observing the responses of its living organisms (Moura e Silva, Queiroz & Trivinho-Strixino, 2008). Ecotoxicology is a discipline that enables the understanding of interaction between substances and organisms through ecotoxicological bioassays (Magalhães & Filho, 2008). These tests use bioindicator organisms, which should preferably be easy to handle in the laboratory, as well as abundant and sensitive (Magalhães & Filho, 2008; Moura e Silva, Queiroz & Trivinho-Strixino, 2008).

Ecotoxicological bioassays must be standardized to ensure the reproducibility of the methodology, yielding reliable results. Although there is no specific information for *Pomacea figulina*, species of this genus are known to have a short life cycle (one to four years), rapid growth (Hayes et al., 2015) and occurs at high densities in the Sorocaba River Basin, in the state of São Paulo, Brazil (Rodrigues et al., 2016), which indicates their use as environmental bioindicators. Other aspects that can be considered regarding *Pomacea* as a good biological bioindicator are its sedentary (low mobility) (Seuffert; Martín, 2012), which ensures that the detected impacts reflect the conditions of a specific location, and its bioaccumulation capacity (Campoy-Diaz et al., 2018, 2020; Vega et al., 2012; Yap et al., 2023), which allows the detection of known and emergent contaminants, such as microplastics (Khamboonruang et al., 2024, Yao et al, 2025), in its tissues even at low concentrations in water. Furthermore, it is an

abundant organism in the region, which facilitates sampling; it has a known life cycle and taxonomy, allowing for precise comparisons in the laboratory; and it exhibits predictable sensitivity to environmental stressors, functioning as a "living sensor" capable of signaling ecological or chemical changes clearly and measurably. Its benthic habit makes it highly suitable for freshwater sediment toxicity tests (Gonçalves et al., 2014). Toxicity tests for herbicides and trace metals have already been conducted with species of the genus *Pomacea*, such as *Pomacea lineata* and *Pomacea canaliculata* (Melo et al. 2000; 2014; Dumme et al 2012), which demonstrated that these species are sensitive to herbicides and accumulate heavy metals, primarily in the digestive tract and digestive gland. However, there are no breeding protocols for these organisms that would allow them to become standard models in such tests, which would be appropriate for their use as bioindicators in order to produce comparable results and ensure animal welfare. Many variables can influence the growth and survival of species of the genus *Pomacea*, such as diet, temperature, and density (Lima et al, 2006; Seuffert & Martin, 2013; Garr et al, 2011).

The present study aimed to establish a standardized nutritional protocol for rearing *Pomacea figulina* under laboratory conditions, providing a controlled framework that can ensure reproducibility and reliability in ecotoxicological bioassays. By identifying optimal conditions for diet, survival, and growth, this work seeks to facilitate the use of *P. figulina* as a model bioindicator species. Standardizing laboratory maintenance not only allows for comparable results across studies but also contributes to animal welfare and enhances the capacity to detect and monitor environmental contaminants in freshwater ecosystems. Ultimately, this approach supports both the advancement of ecotoxicological research and the broader application of *P. figulina* in environmental monitoring programs.

Methodology

Field Sampling and Pre-Experimental Maintenance of Organisms

Egg masses of *Pomacea figulina* were collected from the Pirajibu-Mirim River, in the municipality of Sorocaba (23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W), during the species' reproductive period (February 2025). Collection was carried out manually along the riverbanks. Using gloves and careful sliding through the vegetation, the egg masses were removed to avoid breakage. In total, 16 egg masses were collected and transported to the laboratory in a styrofoam box, kept in a dry environment and without contact with water.

In the laboratory, the egg masses were divided into 4 trays with 500 mL of dechlorinated water (bubble-dechlorinated water) and transferred to a BOD-type incubator, under a photoperiod of 12 h light/12 h dark and a constant temperature of $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Every 2 days, hatching was checked; the hatched animals were pushed into the water with the aid of a brush, and the water volume was replenished as needed. After 20 days in the incubator, the hatched snails were transferred to trays containing dechlorinated water (bubble-dechlorinated water), a temperature of $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ controlled by a thermostat (Aqua Pet), airflow with a biological filter, and kept for 22 days in an adaptation phase. During this period, the water was changed every 4 days by inverting the tray, using a sieve (0.005 mm^2) to prevent loss of any snails. With each water change, 1 g of crushed ornamental fish food (Pond Koi Vibrance Tetra™) was offered until the start of the experimental phase. This commercial feed was chosen because it has a high protein content (31%). Previous studies indicate that high-protein diets are suitable for gastropods (Islam et al. 2021). Therefore, we opted to equalize survival opportunities given the high mortality rate shortly after birth. We waited about 15 days to select those that survived.

Development and preparation of experimental diets

Four distinct experimental diets were developed: The first diet (TR1) consisted exclusively of crushed commercial ornamental fish food (Pond Koi Vibrance Tetra™). For its preparation, the feed granules were mechanically crushed using a blender and sieved through a 1.00 mm mesh to standardize particle size, favoring ingestion by the individuals. The resulting particles were stored in glass containers. The particles were placed in 100 ml borosilicate glass containers and stored in a sheltered place to protect them from light and moisture. This commercial feed was chosen because it has a high protein content (31%).

The second diet (TR2) was prepared using crushed organic kale (*Brassica oleracea*) leaves. The preparation involved washing the leaves in running water and then drying them in a convection oven (Mondial - 1500 W) at $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes. Subsequently, the dried leaves were crushed in a blender (Philips Walita Liqfaz - 350 W) for 2 minutes to obtain a homogeneous powder. This powder was then stored in glass jars in a dry location until it was used.

The third diet (TR3) corresponded to the combination of crushed commercial feed with dehydrated kale powder, in a 1:1 mass ratio (fish food + *Brassica oleracea*). The homogenization of the ingredients was carried out manually in a clean environment, and the resulting mixture was stored in a closed container at room temperature.

Finally, the fourth diet (TR4) was formulated as a standard laboratory diet, consisting of crushed commercial food (Pond Koi Vibrance Tetra™), ground eggshell, agar, and distilled water. The eggshells were previously washed, dried in an oven at 60°C, ground, and sieved into a fine powder. The agar was prepared at a concentration of 1.5% in distilled water heated to 95°C, acting as a binding agent (Phillips; Willians, 2009). All ingredients were mixed until a homogeneous paste was formed, the mixture was manually molded into 0.25 g spheres and stored under refrigeration at 4 °C. The nutritional composition of the feeds can be found in the supplementary material Table S1.

Experimental Setup and Execution

After the adaptation phase, *Pomacea figulina* individuals were randomly distributed to begin the experimental tests, organized into four distinct feeding treatments, corresponding to the diets previously described. Each treatment consisted of 10 aquariums, totaling 40 experimental units. The aquariums were filled with 1.2 liters of dechlorinated water and maintained under controlled environmental conditions of oxygenation and temperature at 24°C ± 1 °C, equipped with an air stone aeration system and a biological filter. For oxygen control, a pump with a power of 3W (1000 A), flow rate of 4.2 L/min and pressure of 0.014 MPa was used in each replicate, commonly used in aquariums, ensuring water oxygenation. Lower-intensity aeration was selected to minimise potential stressors associated with higher-intensity aeration, thereby reducing possible impacts on the collected data.

The filter was made of PVC pipe and filled with activated carbon, limestone, and tow, aiming to help maintain ammonia levels. The pH varies from 8 to 8.5, measured by a k39 Kasvi digital portable phmeter, every 4 days. Three individuals were allocated to each aquarium, resulting in a total of 120 specimens at the beginning of the experiment, with 30 individuals per treatment.

The experimental systems were maintained every four days. This maintenance included cleaning the aquariums, removing leftover food, completely changing the water and offering a standardized diet (0.25 g per bottle). This regimen was followed to ensure the physicochemical quality of the environment and prevent the buildup of nitrogenous waste, such as ammonia.

Morphometric assessments, weighing of individuals, and mortality checks were performed weekly throughout the 10-week duration of the experiment.

Morphometric and Mortality Analysis

To perform the length measurements, a Leica image capture camera (model MC 170 HD) was used, coupled with a stereomicroscope (Leica S8AP0) and measurement software (LAS v4.11). From week 4 onwards, the measurement was performed with a ZaaS IP54 digital caliper, due to the camera's limitations in capturing the size of the animals (Fig. 1). The length was obtained from the apex of the shell to its furthest opposite end, as shown in Figure 1. The weight of the animals was obtained using an AUY220 analytical balance ($\pm 0.0001\text{g}$ precision). The phases of the experimental process are summarized in Figure 2.

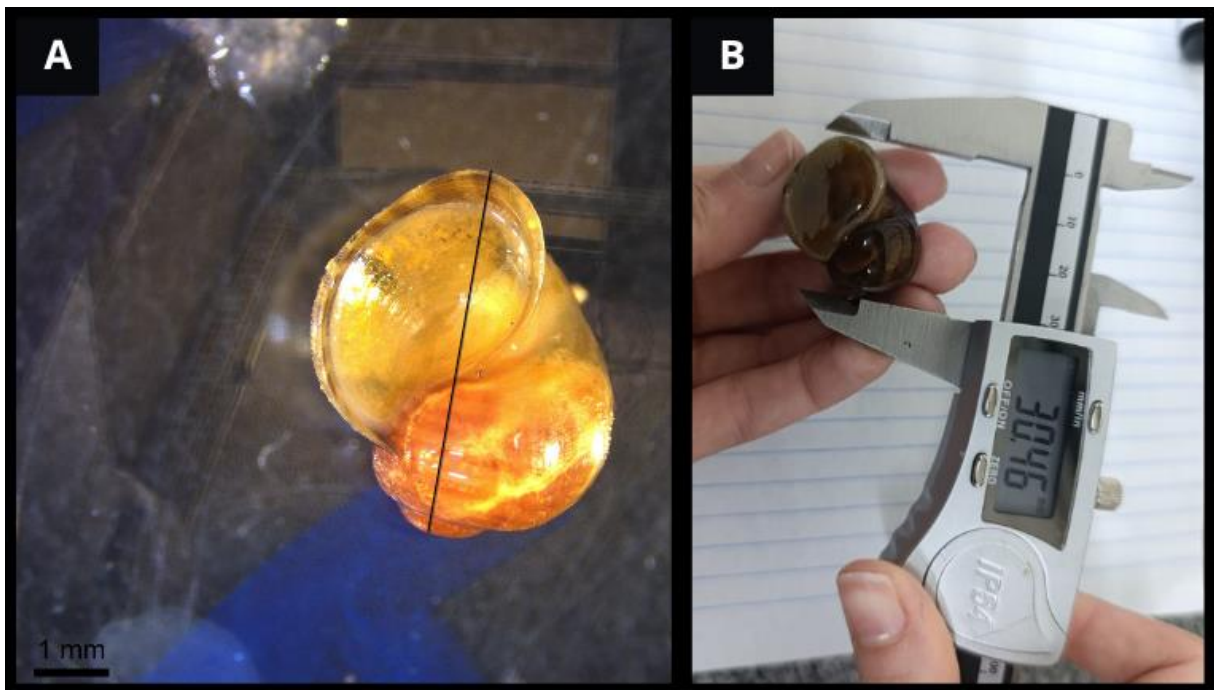


Fig.1 Representation of the shell length measurement methods for *Pomacea figulina* individuals. (A) Close-up view of the translucent shell positioned under a stereomicroscope using LAS v4.11 software. A black reference line indicates the axis along which the shell length is measured; a 1 mm scale bar appears in the lower left corner; (B) Manual measurement of the shell of an adult gastropod using a digital caliper. A person's hands hold the shell while the caliper displays the recorded length measurement on its digital screen.

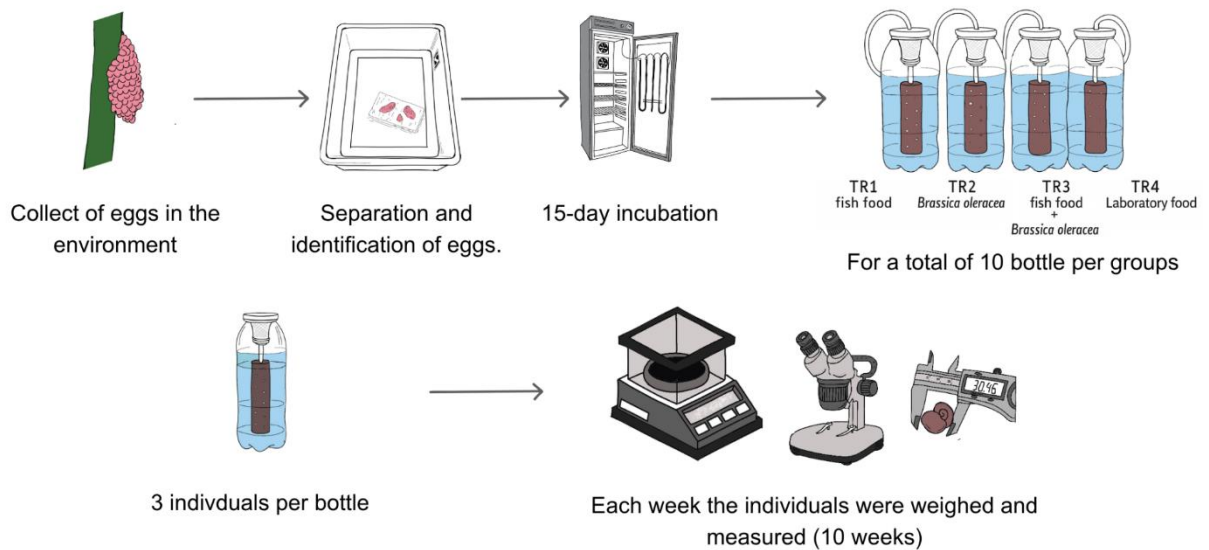


Fig. 2 Schematic representation of the methodological sequence. Eggs are collected from the environment and subsequently separated and identified in the laboratory. After an incubation period of 15 days, the groups were distributed into experimental flasks (n=10), each containing three individuals, totaling 30 organisms in the different treatments. Weekly, for ten weeks, the individuals are weighed on an analytical balance and measured under a stereomicroscope and/or caliper to monitor growth.

Analysis of toxic ammonia

During the first month of exposure, the water in the bottles was monitored weekly for toxic ammonia (NH₃) content, a substance produced from the decomposition of organic matter (Zhang et al., 2023) and the excretion of nitrogenous waste by animals (Cruz et al., 2013). For this, a toxic ammonia measurement kit for freshwater (LabconTest) was used. The table provided by the manufacturer was adopted as the water quality parameter, since there are no established parameters for gastropods. This data is available in the supplementary material table S2.

Calculation of weekly growth percentage

To obtain the weekly growth rate (TR), the final mean mass (\bar{x} final) was subtracted from the initial mean of the treatment (\bar{x} initial); the difference was divided by the experiment time (t_{exp}) (10 weeks) (Equation 1):

$$TR = \frac{\bar{x} \text{ final} - \bar{x} \text{ initial}}{t_{exp}} \text{ (Equation 1)}$$

To obtain the weekly growth rate (GGR) as a percentage, TR was divided by the initial mean treatment mass (\bar{x} initial) and then multiplied by 100 (Equation 2).

$$GGT = \frac{TR}{\bar{x}_{initial}} \cdot 100 \text{ (Equation 2)}$$

Statistical Analyses

The distribution of the data was verified by Grubbs' test for outlier removal, followed by the Shapiro-Wilk normality test, and the homogeneity of variances was assessed by Levene's test. Since the assumptions of normality and homogeneity were not met, the non-parametric Kruskal-Wallis test was employed to compare the independent groups. Specific differences between pairs of groups were subsequently identified by Dunn's post-hoc test. A p-value less than 0.005 was defined as the threshold for statistical significance.

Results

The first individuals hatched in the incubator ten days after collection. Between the first hatchings, there was a ten-day interval until the last individuals were ready for transfer to the aquarium, thus beginning the acclimatization phase.

Treatment TR2 (*B. oleracea*) showed the highest mortality rate, reaching 83.3% of individuals, with only 5 individuals remaining at the end of the experiment (Fig. 3). This explains the decrease in weight and average length of individuals between the 7th and 9th weeks, since smaller organisms survived after the decrease (Fig. 4). Treatments TR1 (fish food) and TR3 (fish food + *Brassica oleracea*) showed intermediate mortality rates, reaching the end of the experiment with 17 and 14 individuals, corresponding to 43% and 53% mortality, respectively. In both groups, the highest mortality was recorded in the first three weeks: TR1 (53.3%) and TR3 (36.6%). However, treatment TR4 (laboratory diet) showed the lowest mortality rate (26.7%), decreasing from 30 to 27 individuals in the second week, from 25 in the sixth, and from 22 from the sixth week onwards, complete results are shown in Supplementary material Table S7.

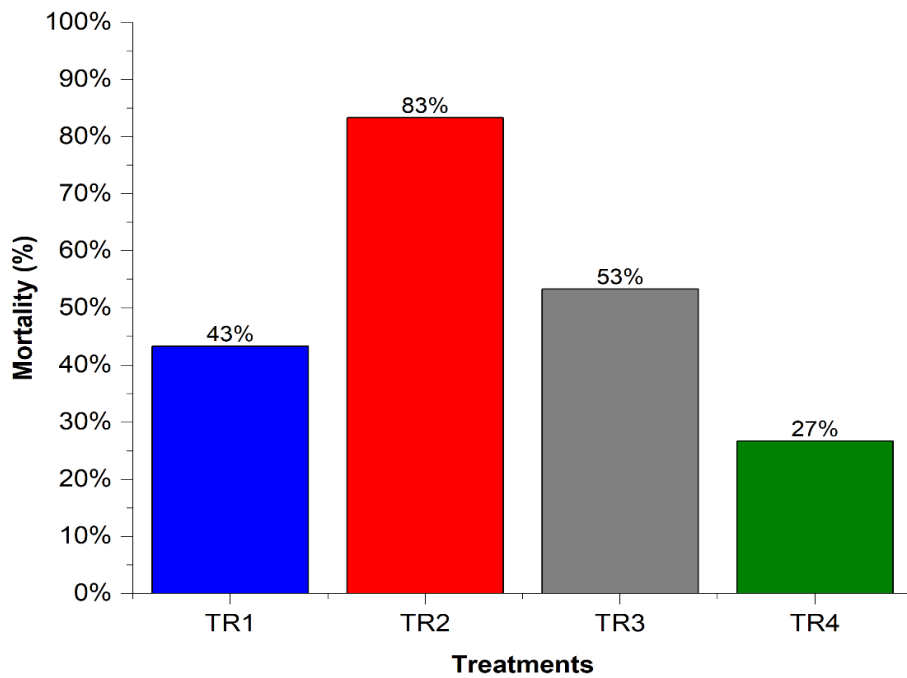


Fig. 3

Bar graph showing percentage of mortality of *P. figulina* at the end of the experiment (10 weeks), according to the feeding treatments. Mortality per week is recorded in the supplementary material. TR1: fish feed (Gray); TR2: *Brassica oleracea* (Red); TR3: fish feed + *Brassica oleracea* (Blue); TR4: standard laboratory diet (Green).

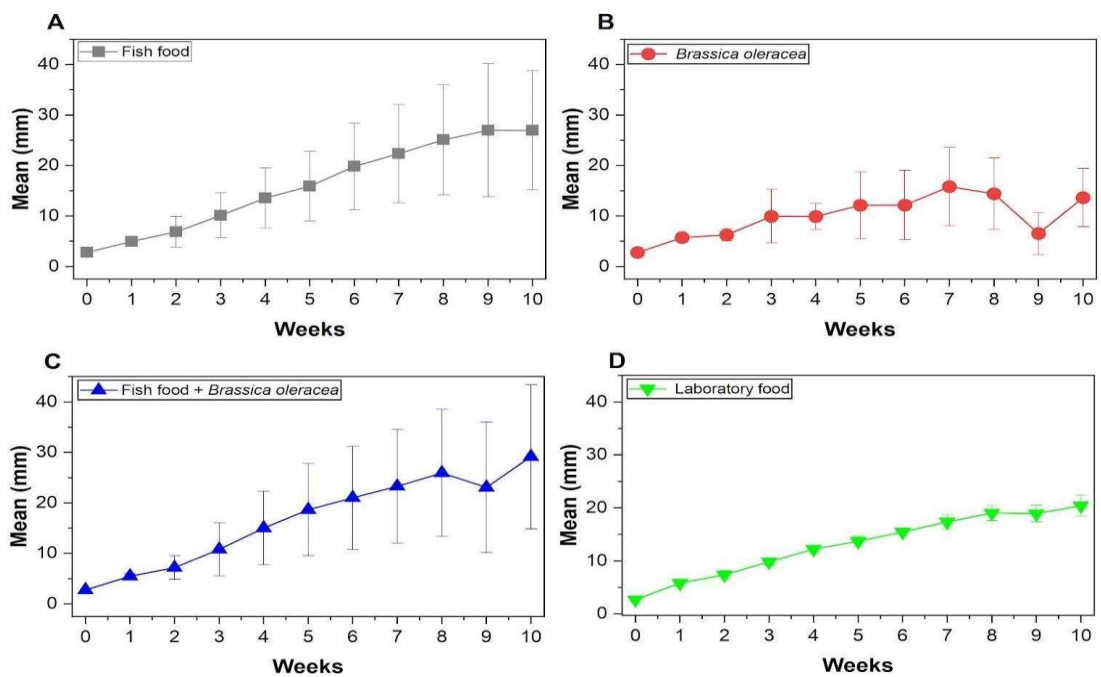


Fig. 4 Line graph showing mean size (mm) (\pm standard deviation) of *P. figulina* over 10 weeks, subjected to four different diets. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet.

The biomass of *P. figulina* showed a growth trend after two weeks of experimentation under different feeding regimes (Fig. 5). Treatment 3 promoted the greatest mean mass gain (1.90 ± 2.19 g) over the 10 weeks, followed by TR1 (1.82 ± 2.09 g). TR2 resulted in the lowest mass gain and a reduction in mean mass from the eighth week onwards. TR4 showed stable and intermediate growth, with performance inferior to TR1 and TR3. (Figure 6).

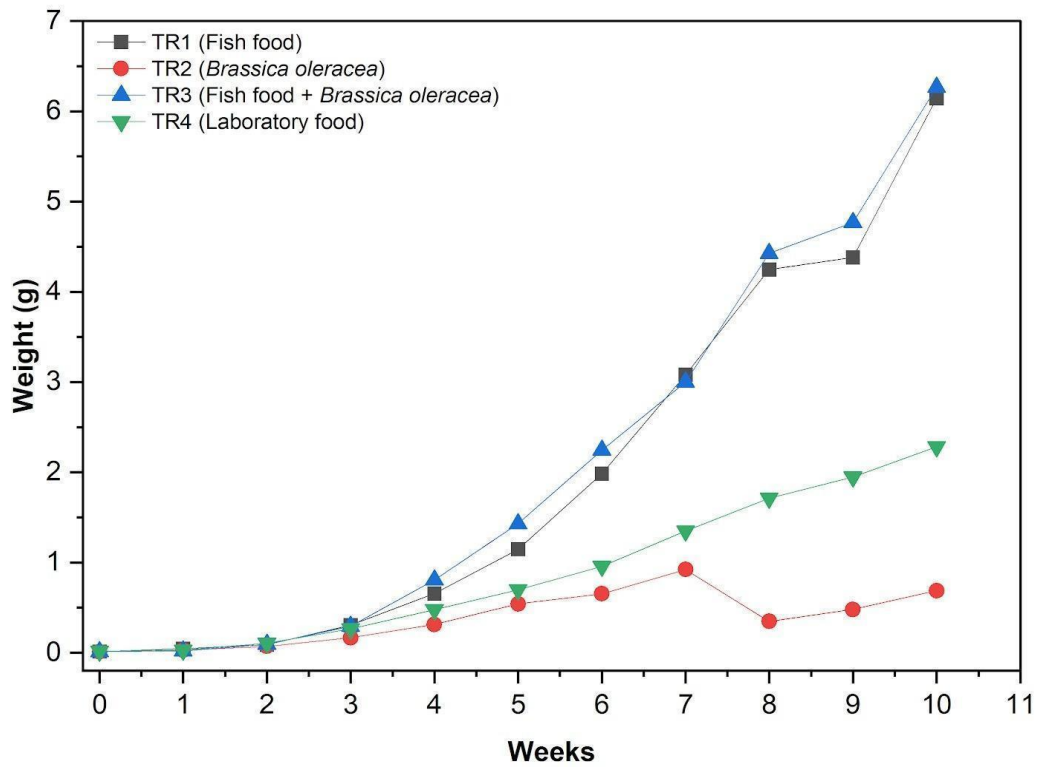


Fig. 5 Line graph showing mean weight (g) of *P. figulina* (in grams) over 10 weeks, under different feeding regimes. TR1: fish feed (Gray); TR2: *Brassica oleracea* (Red); TR3: fish feed + *Brassica oleracea* (Blue); TR4: standard laboratory diet (Green).

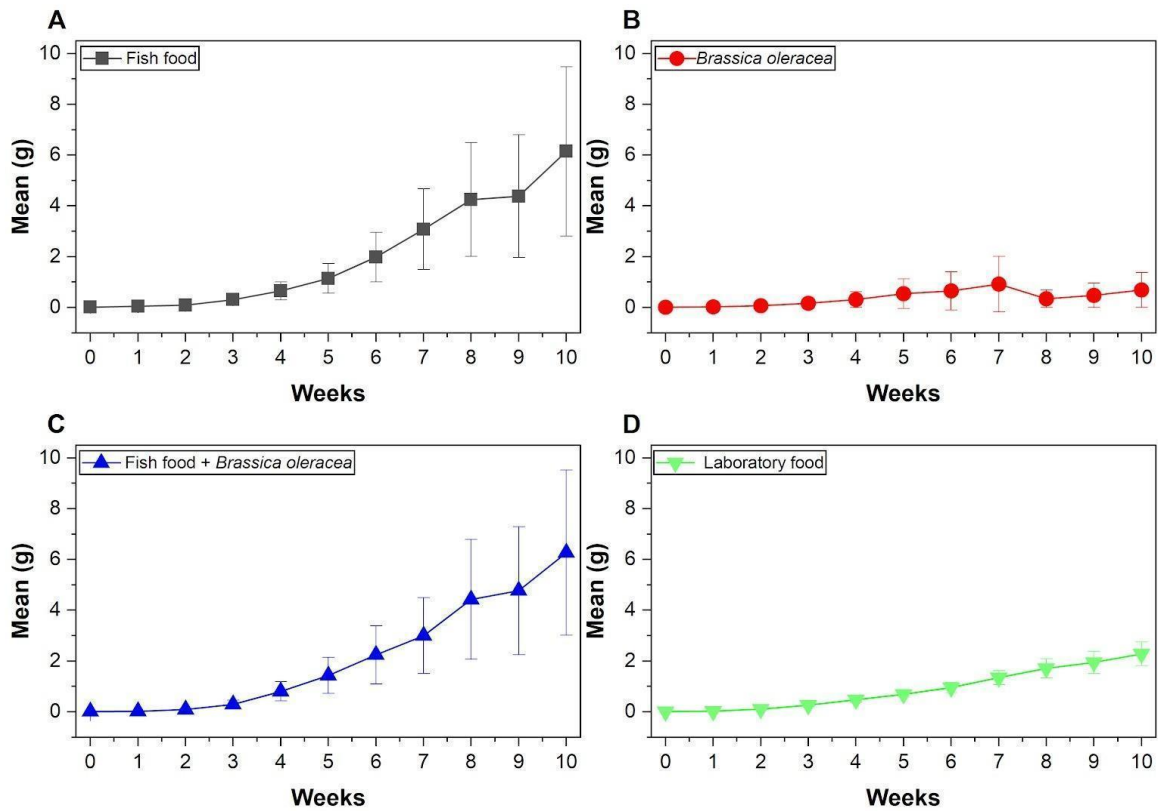


Fig. 6 Line graph showing mean weight (g) (\pm standard deviation) of *P. figulina* over 10 weeks, subjected to four different diets. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet.

In the statistical comparison between treatments in relation to median mass (g), using the Kruskal-Wallis ANOVA test ($p < 0.005$), TR3 presented the highest median body mass (0.94 g), followed by TR1 (0.93 g) and TR4 (0.65 g). These three treatments presented significantly higher values ($p < 0.001$) compared to the median of TR2 (0.12 g). There was no statistically significant difference between TR1, TR3, and TR4. The statistical results are available at supplementary material Table S3 and Figure S1.

The length of the individuals showed a pattern similar to that observed for body mass (Fig. 7). After 10 weeks of the experiment, treatment TR3 recorded the greatest mean growth (15.30 ± 9.06 mm), followed by treatments TR1 (14.77 ± 8.75 mm) and TR4 (13.00 ± 5.78 mm) (Fig.4). In contrast, TR2 showed the smallest mean increase, reaching 8.44 ± 4.37 mm at the end of the experimental period (Supplementary Material Table S4). Furthermore, the estimate of mean weekly growth indicated superior performance in TR3 (2.64 mm/week), followed by

TR1 (2.41 mm/week) and TR4 (1.77 mm/week), while TR2 again showed the lowest value (1.09 mm/week) (results can be seen in supplementary material Table S5).

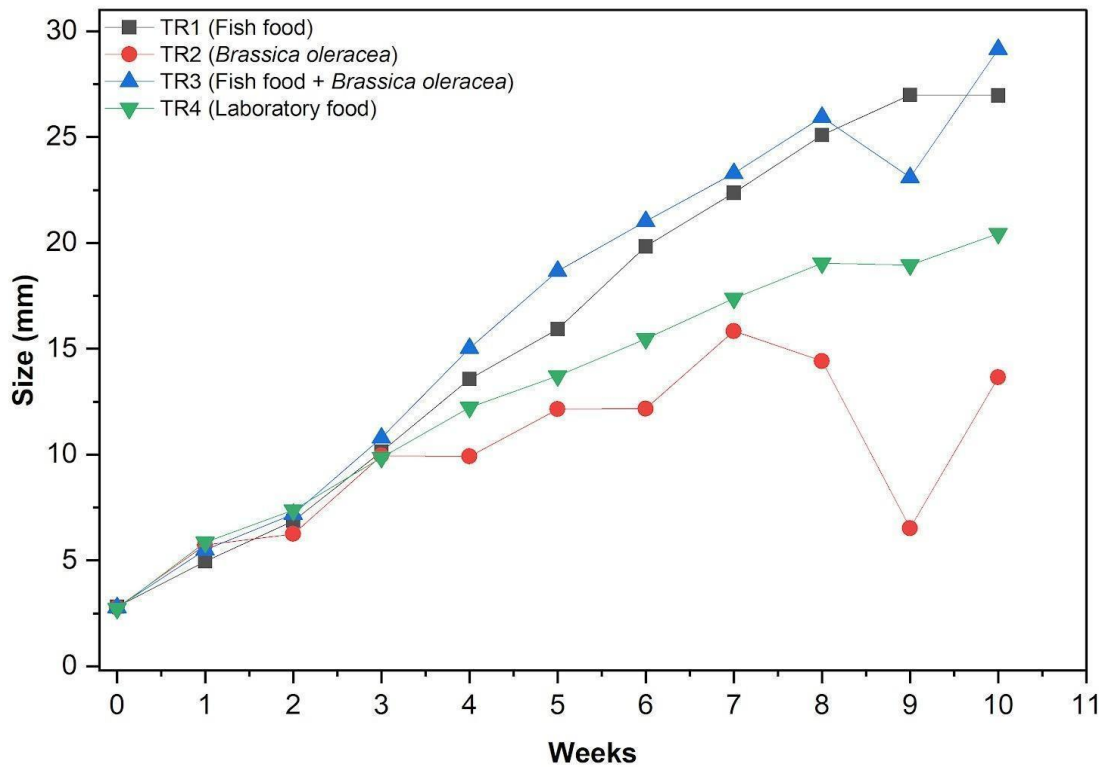


Fig. 7 Line graph showing mean size (mm) of *P. figulina* (in millimeters) over 10 weeks, under different dietary regimes. TR1: fish feed (Gray); TR2: *Brassica oleracea* (Red); TR3: fish feed + *Brassica oleracea* (Blue); TR4: standard laboratory diet (Green).

Statistical analyses showed that only TR2 differed significantly from the others, presenting the lowest median (7.67 mm) among the treatments. Treatments TR4, TR1, and TR3 exhibited medians of 13.44 mm, 14.39 mm, and 15.18 mm, respectively, with no statistically significant difference between them.

Discussion

Vendramini & Arruda (2022) identified the species *Pomacea figulina* as a possible environmental bioindicator for the southeastern region of Brazil, especially for the Sorocaba River Basin, one of the main tributaries of the Tietê River. Bioindicators have been used to

study environmental toxicity and as demonstrated by Marques et al. (2021) and Coen and Janssen (1997), an adequate diet is essential for the success of the experiment because it affects growth, reproduction, and sensitivity to toxicants, thereby drastically altering bioassay endpoints.

In this work, we explored how different diets could have different performances in the rearing and survival of *Pomacea figulina* specimens under laboratory conditions. Studies with species of the same genus have shown that diet, density, and temperature can influence growth and survival of the species (Alves et al., 2006; Seuffert & Martin, 2013; and Garr et al., 2011). Although pink-colored egg clutches were carefully selected (Hayes, 2015), variations in the oviposition day may still have occurred, resulting in differences in embryonic developmental stages and potentially influencing the hatching period.

We found that a diet composed of fish feed plus kale, showed the best performance related to size and weight over 10 weeks of the experiment. Garr et al. (2011) conducted a similar experiment with *Pomacea paludosa* and found that the mixture of catfish feed associated with *Ulva* (seaweed) showed better performance, followed by the diet with feed only in relation to the diets composed only of Romaine Lettuce, only *Utricularia* and only *Ulva*. The catfish feed used by the authors had a high protein concentration (34.2%), indicating that the amount of protein may be a determining factor in the result obtained, along with lipids (8%), vegetable fibers, and vitamins. However, the lack of information on the feed formulation hinders replication. The choice of Pond Koi Vibrance Tetra™ feed is similar in composition, containing 31% protein, 6% lipids, 7% minerals and 1% calcium. Other study by Islam et al. (2021) demonstrated that fish feed with a dietary protein concentration between 30% and 35% was more effective for the weight gain of apple snails (*Pila globosa*) than diets composed exclusively of fish meal (90%–99% protein) or a combination of fish and algae.

In the present work, the feed used has 31% protein, these values align with the range identified in the aforementioned researches. Furthermore, commercial feeds available in the Brazilian market consistently meet this protein proportion. This concentration of protein was sufficient to support animal growth as evidenced by the performance observed in treatments TR3 with fish food + organic kale diet and TR1 with fish feed diet were the most effective. TR3 combined protein with other interesting substances present in kale, such as calcium, selenium, potassium, magnesium, phosphorus, iron, manganese, and copper (Thavarajah et al., 2019), as well as different concentrations of vitamins A, K, and C, (Farnham et al., 2012), which are

important for tissue integrity, calcium metabolism, and immunity, and may have acted synergistically to benefit the physiological fitness and survival of individuals (Mladěnka et al., 2021, Brancaccio et al., 2022). The laboratory water used had low calcium levels, so if there wasn't enough calcium in the feed, this affected mortality, as in TR1. In TR3, calcium was added in addition to the feed. Therefore, the laboratory feed had a low mortality rate. Conversely, diets with less protein showed the worst performance in almost all observed parameters. However, the standard laboratory diet (TR4) differed from the other treatments in terms of mortality, presenting the highest survival among treatments and being the only parameter to show a statistically significant difference. Regarding treatment TR2, a diet of organic kale only, the low efficacy of this treatment is consistent with the patterns observed in Figures 4 and 6, where there is a sharp drop in average mass and length from the eighth week onwards, when the number of individuals in this treatment decreased from 27 in the third week to 23 in the fourth and 9 in the sixth, representing a 60% drop in three weeks.

It is worth highlighting that the amount of food offered per bottle remained the same from the beginning to the end of the experiment. Thus, in aquariums with fewer individuals, the supply of food exceeded the demand, which resulted in greater decomposition of organic matter and possibly greater release of ammonia (Jones et al. 1982). Therefore, we recommend that future studies adjust feed quantities periodically according to weekly growth and animal density per treatment.

This decomposition was reflected in the strong odor of treatments TR2 and TR3. This factor, however, may not have been the only reason for the sulfurous odor. Both treatments were the only ones to receive kale, a vegetable rich in sulfur compounds, especially glucosinolates, which, when degraded by enzymes or bacteria, generate substances with an intense odor (Marcinkowska & Jeleń, 2020).

The treatment 4 showed a gradual and constant growth curve over the weeks. Compared to the feed + kale and feed-only diets, its protein content was lower. However, it contained higher amounts of calcium and agar-agar. Since the water in the experiment had little calcium, the higher presence of this mineral in the laboratory diet seems to have positively influenced both continuous growth and low mortality. The observed result cannot be attributed solely to the crude protein level (31%), as studies with aquatic organisms demonstrate that zootechnical performance depends on the balance between protein and energy, mineral availability, and physical stability of the diet (NRC, 2011; Obaldo et al., 2002). The addition of calcium

carbonate likely improved the calcium and phosphorus ratio, favoring shell mineralization, a crucial factor for gastropods (Tanaka et al., 1999). Furthermore, since less commercial feed was provided, the nitrogen load in the system was reduced, promoting better water quality and decreasing mortality (Boyd, 2015).

Apple snails cultured in water on diets with higher calcium availability exhibit enhanced growth and develop larger, more robust shells that are less susceptible to breakage and erosion. Research by De Jesús-Navarrete (2023) demonstrated that for *Pomacea flagellata*, higher calcium concentrations in the water (500 mg/L) resulted in increased shell size, weight, and hardness compared to lower concentrations. Similarly, L. Binh et al. (2021) showed that in *Pila polita*, a diet containing approximately 5% calcium maximized weight gain and overall productivity. Furthermore, calcium deficiency in various snail species has been shown to result in thin, fragile shells, stunted growth, and increased mortality (Ireland, 1991; Egonmwan, 2006; Rygało-Galewska, 2023).

In addition to diet, an important variable that affects both growth and mortality of apple snails, such as *P. figulina*, is density. Previous studies have shown that densities greater than 2 ind./m² negatively affect the growth of *Pomacea canaliculata* in water flow conditions (Tanaka et al., 1999), while for *Pomacea paludosa*, these values were higher, at 8 ind./ m² for a static system with air-driven filters (Conner et al., 2008). Garr et al. (2010) were able to successfully rear *Pomacea paludosa* with up to 100 ind./m², and exhibiting a weekly growth of 2.5 mm. The authors attributed this result to the artificial water recirculation system incorporated into their experiment, which prevents the accumulation of metabolites and other chemical substances released by the snails, which likely inhibit growth. However, there is a knowledge gap regarding the determination of an ideal density based on animal biomass per water volume. In this experiment, density was not the main focus and, therefore, was not evaluated.

Considering the experimental setup used, with 3 individuals in 1.2 L, it is possible to state that the system functioned under a relatively high stocking density, approximately 3 individuals per 0.007 m². Studies on *Pomacea dolioides* indicate that, in static systems with regular water exchange, higher densities were tested (up to 10 individuals/L) (Pires-Júnior; Hattori; Sant'Anna, 2019). Other studies with the species *Pomacea bridgesii* and *Pomacea lineata* pointed to a limit of up to 1.5 individuals/L (Junior et al., 2013), this difference in density is explained by the species, since the body mass of *Pomacea bridgesii* and *Pomacea lineata* is greater than that of *Pomacea dolioides* from the juvenile stage. However, the lack of

methodological standardization prevents concluding a superior intrinsic tolerance of the species. Both studies show that, in experiments conducted in static environments, the ideal is to calculate biomass (grams) in relation to water volume (L).

Therefore, we suggest that future research investigate how density and pH affect the growth, mortality, and reproductive performance of this species under laboratory conditions. These analyses will contribute to improving cultivation protocols, increasing the reliability of experimental results, and ensuring animal welfare.

Conclusion

Diet has a direct influence on the growth and survival of *Pomacea figulina* under laboratory conditions. Both Treatments 1 (fish food) and Treatment 3, which combines fish feed and kale, proved to be the most effective in promoting mass and length gain due to the combination of protein and nutrients present in kale. Treatment 4 (laboratory diet) showed more modest growth but stood out for its lower mortality rate, probably due to the calcium supplementation. In contrast, Treatment 2 (kale) showed the lowest performance, reflecting a low growth rate and high mortality, highlighting that a diet composed exclusively of vegetables is not recommended for the maintenance and cultivation of this species in the laboratory. Our findings reinforce the importance of nutritional balance in the formulation of experimental diets for *P. figulina*, demonstrating that the association of protein-rich feed with plant sources can optimize the biological performance of laboratory-reared organisms. Conversely, diets with less protein showed the worst performance in almost all observed parameters. However, the standard laboratory diet (TR4) differed from the other treatments in terms of mortality, presenting the highest survival among treatments and being the only parameter to show a statistically significant difference. Additionally, our results highlight the importance of calcium availability, particularly when water does not provide sufficient minerals to support shell growth.

Standardizing a laboratory rearing protocol for *Pomacea figulina* is fundamental to ensuring scientific reproducibility, allowing this native species to act as a reliable bioindicator of ecosystem health. By establishing parameters for diet, aeration, and water quality, the "noise" of external variables is eliminated, guaranteeing that the observed physiological responses are caused exclusively by the pollutants tested and not by management stress. Furthermore, controlled cultivation respects the species' original geographic distribution (focused on the Northeast and Southeast regions of Brazil), providing a solid basis for comparisons, which is

essential for monitoring the long-term impact of contaminants and environmental changes on local biodiversity.

List of Abbreviations

Not applicable.

Supplementary Information

Below is the link to the electronic supplementary material.

Supplementary file1 – Supplementary Material 1

Acknowledgements

The authors acknowledge the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) and the Ministry of the Environment (MMA) for the authorization of scientific purpose number: 97713-1. We also thank Silvana C. Thiengo for the information regarding the geographic distribution of *P.figulina* and the anonymous reviewers for their time and constructive comments on our manuscript.

Author contributions

N.W, F.M.A.T, S.L.S.S., G.I.A.S., B.N.S.M., M.I. and E.P.A. were involved in conceptualization, methodology, investigation and writing. N.W, F.M.A.T, S.L.S.S., G.I.A.S., B.N.S.M., M.I., L.C.B. and E.P.A. contributed to validation; visualization; writing; review and editing. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Funding Code 001 and São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant n° 2024/17526-0.

Data availability

All data and materials are contained within the manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

Alves, T., Lima, P., Lima, S. F. B., Ferri, A. G., Barros, J. C., & Machado, J. (2006). Growth of *Pomacea lineata* and *Pomacea bridgesi* in different stock densities. *Thalassas*, 22(1), 55-64.

Brancaccio, M., Mennitti, C., Cesaro, A., Fimiani, F., Vano, M., Gargiulo, B., Scudiero, O. (2022). The biological role of vitamins in athletes' muscle, heart and microbiota. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1249. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/3/1249>.

Campoy-Diaz, A. D., Escobar-Correas, S., Canizo, B. V., Wuilloud, R. G., & Vega, I. A. (2019). A freshwater symbiosis as sensitive bioindicator of cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(3), 2580–2587. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07082-x>.

Conner, S. L., Pomory, C. M., & Darby, P. C. (2008). Density effects of native and exotic snails on growth in juvenile apple snails *Pomacea paludosa* (Gastropoda: Ampullariidae): a laboratory experiment. *Journal of Molluscan Studies*, 74(4), 355–362. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyn024>.

Cruz, M. J., Sourial, M. M., Treberg, J. R., Fehsenfeld, S., Adlimoghaddam, A., & Weihrauch, D. (2013). Cutaneous nitrogen excretion in the African clawed frog *Xenopus laevis*: Effects of high environmental ammonia (HEA). *Aquatic Toxicology*, 136-137, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.002>.

De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 43–55. <https://doi.org/10.1023/a:1008228517955>.

Dumme, V., Kruatrachue, M., Trinachartvanit, W., Tanhan, P., Pokethitiyook, P., & Damrongphol, P. (2012). Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, aquatic plant and histopathological effects on the golden apple snail in Beung Boraphet reservoir, Thailand.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 86, 204–212.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.018>.

I. Egonmwan, R. (2020). “Effects of Dietary Calcium on Growth and Oviposition of the African Land Snail *Limicolaria Flammea* (Pulmonata: Achatinidae).” *Revista de Biología Tropical*, vol. 56, no. 1, 1 Mar. 2006, <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i1.5528>.

Farnham, Mark W, et al. “Collard, Mustard and Turnip Greens: Effects of Genotypes and Leaf Position on Concentrations of Ascorbic Acid, Folate, β -Carotene, Lutein and Phylloquinone.” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 27, no. 1, 13 June 2012, pp. 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.04.008>. Accessed 13 Oct. 2025.

Fernandez, M. A. (2011). Impossex em moluscos gastrópodos: aplicações no monitoramento ambiental de um biomarcador tradicional. In: FERNANDEZ, M. A.; SANTOS, S. B.; PIMENTA, A.; THIENGO, S. C. (eds.). *Tópicos em Malacologia: Ecos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia*. Technical Books: 467 pp.

Garr, A. L., Lopez, H., Pierce, R., & Davis, M. (2011). The effect of stocking density and diet on the growth and survival of cultured Florida apple snails, *Pomacea paludosa*. *Aquaculture*, 311(1-4), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.017>.

Gonçalves, E. S., Silva, J. M. B. da, Pavesi, T., & Moreira, J. C. (2014). Importance of analytical determination of reactive intermediates and their reaction products with biomacromolecules: a mini review. *Química Nova*, 37(2). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140053>.

Hayes, K. A., Burks, R. L., Castro-Vazquez, A., Darby, P. C., Heras, H., Martín, P. R., Qiu, J.-W., Thiengo, S. C., Vega, I. A., Wada, T., Yusa, Y., Burela, S., Cadierno, M. P., Cueto, J. A., Dellagnola, F. A., Dreon, M. S., Frassa, M. V., Giraud-Billoud, M., Godoy, M. S., & Ituarte, S. (2015). Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58(1-2), 245–302.

Huaquín, L. G., Panes, L., Osorio, C. (2011). Características morfológicas desarrolladas em Caenogastropoda como bioindicadores de contaminación. In: Fernandez, M. A.; Santos, S. B.; Pimenta, A.; Thiengo, S. C. (eds.). *Tópicos em Malacologia: Ecos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia*. Technical Books: 467 pp.

Ireland, M. P. (1991). The effect of dietary calcium on growth, shell thickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98(1), 111–116. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90587-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90587-3).

Islam, Md. S., Shofiquzzoha, A. F. M., & Begum, N. (2021, July 29). Efficacy of Formulated Feed Preference and Stocking Density on Growth and Survival of Baby *Pila globosa*. Reared in Laboratory Condition. *Semantic Scholar*. <https://doi.org/10.9734/arrb/2021/v36i730401>.

Jones, J. G., Simon, B. M., & Horsley, R. W. (1982). Microbiological Sources of Ammonia in Freshwater Lake Sediments. *Microbiology*, 128(12), 2823–2831. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-12-2823>.

Junior, E. S., Barros, J. C. N. D., Paresque, K., & Freitas, R. R. D. (2013b). The effect of stocking density on the growth of apple snails native *Pomacea bridgesii* and exotic *Pomacea lineata* (Mollusca, Gastropoda). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 85(2), 753–760. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652013000200019>

Pattrawan Khamboonruang, Srawut Klorvuttimontara, Thiti Kanchanaketu, & Taeng-On Prommi. (2024). Microplastic accumulation in the golden apple snail *Pomacea canaliculata* serves as a bioindicator in the urban lowlands of Nakhon Pathom Province, central Thailand. *Ecologica Montenegrina*, 80, 46–61. <https://doi.org/10.37828/em.2024.80.5>.

Pires-Júnior, Amilcar Nogueira, et al. “Effect of Stock Density of Cultured Amazon Apple Snail *Pomacea Dolioides* (Gastropoda: Ampullariidae) in Brazil.” *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 48, 2019, <https://doi.org/10.1590/rbz4820180053>.

Magalhães, D. de P., & Ferrão-Filho, A. da S. (2008). A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Australis*, 12(03), 355–381. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>.

Marcinkowska, M., & Jeleń, H. H. (2020). Determination of the odor threshold concentrations and partition coefficients of isothiocyanates from Brassica vegetables in aqueous solution. *LWT*, 131, 109793. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109793>.

Marques, M. B. L., Brunetti, I. A., Faleiros, C. A., da Cruz, C., Iqbal, H. M. N., Bilal, M., & Américo-Pinheiro, J. H. P. (2021). Ecotoxicological Assessment and Environmental Risk of the Insecticide Chlorpyrifos for Aquatic Neotropical Indicators. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(10). <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05369-9>.

- Melo, L. E. L., Paz, R. J. da, Barbosa, J. E. de L., Watanabe, T., Batalla, J. F., & Robert Anthony. (2014). Chronic toxicity bioassay with ampularid snail *Pomacea lineata* (Spix 1824) (Mollusca: Prosobranchia). *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 1(1), e163. <https://doi.org/10.21472/bjbs.010105>.
- Melo, L. E. L., Coler, R. A., Watanabe, T., & Batalla, J. F. (2000). *Hydrobiologia*, 429(1/3), 73–78. <https://doi.org/10.1023/a:1004020529504>.
- Mladěnka, P., Macáková, K., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Mrštná, K., Carazo, A., Protti, M., Remião, F., Nováková, L., & The Oomonom researchers and collaborators. (2022). Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity. *Nutrition Reviews*, 80(4), 677–698. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab061>.
- Moura E Silva, M. S. G.; Queiroz, J. F.; Trivinho-Strixino, S. (2008). Indicadores Biológicos De Qualidade. In: Moura E Silva, M. S. G.; Queiroz, J. F.; Trivinho-Strixino, S. (eds.). Organismos Bentônicos – Biomonitoramento de Qualidade de Água. *Embrapa Meio Ambiente*.
- Pokhrel, Y.; Burbano, M.; Roush, J.; Kang, H.; Sridhar, V.; Hyndman, D. W. (2018). A review of the integrated effects of changing climate, land use, and dams on Mekong River hydrology. *Water*, 10: 266. <https://doi.org/10.3390/w10030266>.
- Rodrigues, V. M., Pintor, E., Santos, & Costa, M. J. (2016). Comparing two biological indexes using benthic macroinvertebrates: positive and negative aspects of water quality assessment. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 28(0). <https://doi.org/10.1590/s2179-975x4516>.
- Seuffert, M. E., & Martín, P. R. (2011). A lentic dweller in lotic habitats: the behavior of the invasive South American apple snail *Pomacea canaliculata* in flowing water. *Aquatic Ecology*, 46(1), 129–142. <https://doi.org/10.1007/s10452-011-9386-4>.
- Seuffert, M. E., & Martín, P. R. (2013). Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *SpringerPlus*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-312>.
- Tanaka, K., Watanabe, T., Higuchi, H., Miyamoto, K., Yusa, Y., Kiyonaga, T., Kiyota, H., Suzuki, Y., & Wada, T. (1999). Density-dependent growth and reproduction of the apple snail, *Pomacea canaliculata*: a density manipulation experiment in a paddy field. *Population Ecology*, 41(3), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s101440050029>.

- Thavarajah, D., Siva, N., Johnson, N., McGee, R., & Thavarajah, P. (2019). Effect of cover crops on the yield and nutrient concentration of organic kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46847-9>.
- Thiengo, S. C., Hayes, K. A., Mattos A. C., Fernandez, M. A., Cowie, R. H. (2011). A família Ampullariidae no Brasil: aspectos morfológicos, biológicos e taxonômicos. In: Fernandez, M. A.; Santos, S. B.; Pimenta, A.; Thiengo, S. C. (eds.). *Tópicos em Malacologia: Ecos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia*. Technical Books: 467 pp.
- Vega, I. A., Arribére, M. A., Almonacid, A. V., Ribeiro Guevara, S., & Castro-Vazquez, A. (2012). Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8), 3307–3316. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0848-6>.
- Wu, J. Y., Wu, Y. T., Li, M. C., Chiu, Y. W., Liu, M. Y., & Liu, L. L. (2011). Reproduction and juvenile growth of the invasive apple snails *Pomacea canaliculata* and *P. scalaris* (Gastropoda: Ampullariidae) in Taiwan. *Zoological Studies*, 50(1), 61-68.
- Yao, F., Qi, Y., Chen, Y., Qin, Z., Shi, Z., Liu, Z., & Zhang, J. (2025). *Pomacea canaliculata* alters the composition, diversity, function, and assembly of bacterial community in freshwater plastisphere, shifting it closer to gut microbiota. *Journal of Hazardous Materials*, 496, 139211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.13921.1>
- Yap, C. K., Pang, B. H., Cheng, W. H., Kumar, K., Avtar, R., Okamura, H., Horie, Y., Sharifinia, M., Keshavarzifard, M., Ong, M. C., Naji, A., Ismail, M. S., & Tan, W. S. (2023). Heavy Metal Exposures on Freshwater Snail *Pomacea insularum*: Understanding Its Biomonitoring Potentials. *Applied Sciences*, 13(2), 1042. <https://doi.org/10.3390/app13021042>.
- Zhang, T.-X., Li, M.-R., Liu, C., Wang, S.-P., & Yan, Z.-G. (2023). A review of the toxic effects of ammonia on invertebrates in aquatic environments. *Environmental Pollution*, 336, 122374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122374>.

4. CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2

O que os caramujos nos contam? *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) e a contaminação por microplásticos no rio Pirajibu-Mirim

What can snails tell us? *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) and microplastic contamination in the Pirajibu-Mirim River.

Natalia Woppe ^{1,2,3}, Eliane Pintor de Arruda ², Walter Ruggeri Waldman¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), Centro de Ciência e Tecnologia (CCTS), Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

²Grupo de Pesquisa em Poluição Plástica - Universidade Federal de São Carlos.

³Laboratório de Estudos em Macroinvertebrados Bentônicos - Universidade Federal de São Carlos.

RESUMO

Este estudo analisou como ocorre a eliminação de microplásticos em *Pomacea figulina*, coletada no rio Pirajibu-Mirim (23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W) (Sorocaba, São Paulo - Brasil), destacando o processo de depuração. Durante 21 dias de experimento foram caracterizados morfológicamente e cromaticamente os particulados eliminados pelos organismos. As fibras corresponderam à maioria dos particulados encontrados (61%), seguidas por fragmentos (28%), além de menores quantidades de espuma, esferas, pellets e borracha. Observou-se uma variedade de formatos e cores, com predominância de partículas azuis, pretas e transparentes, sugerindo diferentes fontes de poluição. A eliminação dos microplásticos variou ao longo do tempo, sem um padrão contínuo, indicando que pode haver retenção temporária no trato digestório desses gastrópodes. Houve uma possível redução gradativa no tamanho médio das partículas defecadas, o que pode estar relacionado à fragmentação mecânica ou ao trabalho de enzimas digestivas. Esses achados indicam que a eliminação de microplásticos por esses organismos não é constante, ocorrendo em ciclos vinculados a fatores fisiológicos e às propriedades dos contaminantes. Assim, *P. figulina* revela-se um bioindicador eficiente em ambientes de água doce, ajudando a compreender como os microplásticos entram, permanecem e são removidos nestes ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Mollusca; Gastropoda; Poluição plástica; Depuração; Biomonitoramento.

4.1 INTRODUÇÃO

A poluição por microplásticos têm se destacado como um dos principais contaminantes emergentes atuais, devido à sua amplitude de dispersão e potencial de impacto sobre o meio ambiente e organismos aquáticos. Esses particulados, podendo ser resultantes da fragmentação de plásticos maiores ou oriundos de fontes primárias, são encontrados em diferentes ambientes e podem apresentar um risco de bioacumulação e efeitos ecotoxicológicos em organismos (Li et al., 2020; Rochman et al., 2019). Nesse cenário, a identificação de organismos biomonitores é essencial para compreender a dinâmica desses contaminantes em ecossistemas de água doce.

Espécies do gênero *Pomacea* destacam-se como candidatas ao biomonitoramento por sua ampla distribuição, fácil manutenção em laboratório e hábitos alimentares, que favorecem a ingestão acidental de microplásticos (Hayes et al., 2015). Entre elas, a *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) é uma espécie pouco estudada, mas que apresenta características fisiológicas e ecológicas promissoras para esse tipo de investigação.

Este estudo buscou avaliar se *Pomacea figulina* pode ser utilizada como bioindicador da poluição plástica em ambientes de água doce, analisando os resíduos eliminados durante seu processo de depuração, com ênfase em microplásticos. Os objetivos específicos foram: (i) descrever morfologicamente essas partículas quanto ao tamanho, formato, cor e frequência; (ii) verificar possíveis mudanças na quantidade e no tamanho das partículas descartadas ao longo do experimento e (iii) analisar a composição química dessas partículas para confirmar se são polímeros.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e Transporte dos indivíduos

No dia 24 de fevereiro de 2025 foram coletados 24 exemplares adultos do gastrópode *Pomacea figulina* em um segmento do rio Pirajibu-Mirim (23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W), situado no bairro Brigadeiro Tobias, município de Sorocaba, estado de São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas de maneira aleatória ao longo das margens do rio. Os organismos foram acondicionados em recipientes contendo água do ambiente e transportados para laboratório de Fisiologia Animal e Comparada (LaFISC) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba.

4.2.2 Aclimação e Condições Experimentais

No laboratório, os indivíduos foram pesados em balança digital Shimadzu modelo AUY220 e mensurados com paquímetro digital ZaaS modelo IP54 ($\pm 0,01$ mm), registrando-se a massa e o comprimento corporal. Em seguida, os espécimes foram individualmente alocados em aquários de vidro com capacidade de 3 L, equipados com sistema de aeração por pedra porosa e filtro de carvão ativado. O filtro foi confeccionado com tubo de PVC e preenchido com carvão, calcário e estopa, visando auxiliar na manutenção dos níveis de amônia.

Os parâmetros físico-químicos da água, incluindo pH, temperatura e amônia, foram monitorados diariamente para assegurar condições adequadas aos organismos de água doce. A temperatura foi mantida entre 22 °C e 24 °C, sendo verificada com termômetro digital. O pH foi mantido entre 7,2 e 8,0, medido por phmetro portátil digital k39 Kasvi. A concentração de amônia foi monitorada entre 0,25 ppm e 0,50 ppm, utilizando o teste colorimétrico da marca LabconTest, conforme as instruções do fabricante. O período de aclimação estabelecido foi de 14 dias, quando ocorreu a estabilização dos parâmetros físico-químicos, como pH e amônia.

4.2.3 Experimentação

Durante a fase de depuração, com duração de 21 dias, os indivíduos foram alimentados diariamente com 0,5 g de ração formulada em ambiente controlado. A ração continha ingredientes padronizados (Anexo C – Tabela 1), e todas as etapas de alimentação foram realizadas no laboratório. Para reduzir a possibilidade de contaminação cruzada, foi mantido um aquário como controle, sem indivíduos, para monitoramento da qualidade da água (pH, temperatura, amônia e presença/ausência de Mps), além da utilização de membranas para verificar eventual deposição atmosférica de microplásticos (Fig. 8).

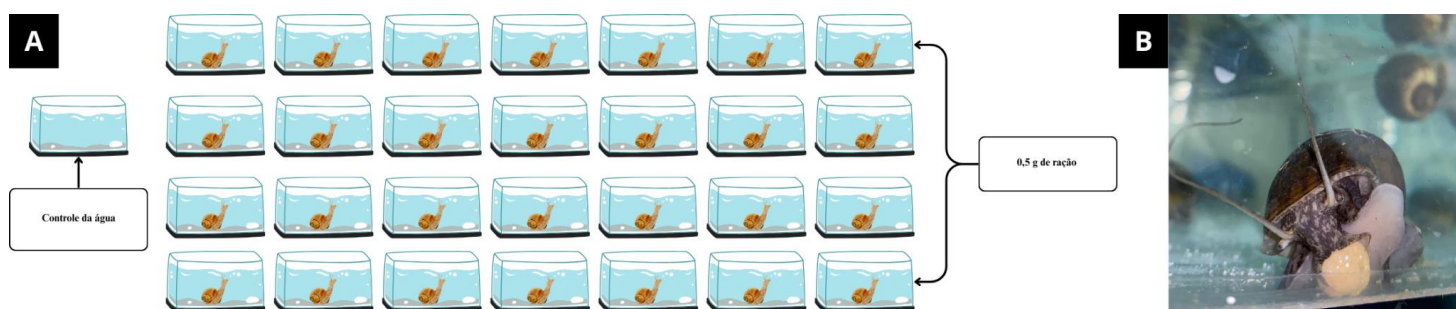


Figura 8. A. Ilustração da organização dos aquários no laboratório de Fisiologia Animal e Comparada (LaFISC). B. Indivíduo da espécie *Pomacea figulina* se alimentando com 0,5g de ração realizada no laboratório.

As fezes foram coletadas a cada quatro dias por meio de sifonagem, com o objetivo de garantir a remoção dos resíduos do fundo dos aquários. Em seguida, as amostras foram peneiradas utilizando uma malha de 0,005 mm² para eliminar partículas maiores e concentrar os particulados de interesse. Posteriormente, as fezes foram armazenadas em béqueres de vidro de 50 mL. O tratamento das amostras foi realizado com 10 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (30%), previamente filtrado três vezes, visando promover a digestão da matéria orgânica residual e facilitar a análise dos microplásticos. As amostras tratadas foram incubadas em estufa a 50 °C por 72 horas, etapa para completar a digestão química e garantir a separação dos particulados de interesse para posterior análise.

4.2.4 Filtragem, análise morfológica e cromática

As amostras foram filtradas a vácuo em um ambiente controlado, utilizando membranas de náilon com porosidade de 5 µm. Para a caracterização morfológica dos particulados foi utilizada uma câmera de captura de imagem Leica (modelo MC 170 HD) associada a um estereomicroscópio (Leica S8AP0) e um software (LAS v4.11); os microplásticos foram classificados morfológicamente segundo a literatura (Markley *et al.*, 2024) correspondendo a classificação: fibra, fragmentos, esferas, pellet, espuma, borracha. Por fim, as partículas foram mensuradas com o software FIJI – Image J.

4.2.5 Caracterização química

Foram analisados quimicamente particulados em uma membrana 25 mm de diâmetro, no Laboratório de química ambiental (LQA), localizado no Instituto de Química na UNICAMP. A análise µFTIR foi realizada utilizando um espectrômetro FTIR acoplado a um microscópio (LUMOS II, Bruker Optics, MA, EUA) equipado com um detector de matriz de plano focal (FPA) de 32×32 pixels. As imagens de infravermelho foram adquiridas no modo de transmissão (sem agrupamento de pixels) com resolução espectral de 4 cm⁻¹ na faixa espectral de 4000 a 600 cm⁻¹, com duas varreduras. O identificador de microplásticos MP-ID foi aplicado para identificar o tipo de polímero presente nas amostras, utilizando um limiar HIT de 700.

4.2.6 Controle de qualidade (branco)

Durante todas as fases do experimento: filtração, visualização e caracterização química, utilizaram-se membranas de 5 µm em placas de Petri, com a adição de água Milli-Q, para monitoramento de eventuais contaminações e deposições atmosféricas. Na etapa relacionada

aos aquários, foi empregado um sistema sob as mesmas condições às quais os indivíduos experimentais foram expostos.

4.2.7 Análise Estatística

A normalidade das dimensões dos particulados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, como não apresentou normalidade utilizou-se análise estatística não paramétrica. O teste de Kruskal-Wallis avaliou diferenças entre grupos (dias de depuração) e, após resultado significativo, aplicou-se o teste de Dunn com ajuste do p-valor para múltiplas comparações.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Cinética de depuração

Durante o período de depuração, *P.figulina* apresentou uma variação na quantidade total de particulados excretados, conforme observado na Figura 9. Entre o primeiro e quinto dia, foram contabilizados 180 particulados encontrados. No nono dia, observou-se um aumento expressivo para 152 particulados e após este dia um decréscimo na quantidade encontrada. Esta oscilação pode estar relacionada ao processo de aclimatação da temperatura e pH que foram expostos, estabilização fisiológica dos indivíduos após a coleta e realocação em ambiente controlado (Hayes et al., 2015, Seuffert et al., 2013).

Os particulados, excretados ao longo da depuração, demonstram que a *P.figulina* possui um processo de digestão lento e uma eliminação gradual, armazenando resíduos em seu trato digestório por semanas e conseqüentemente, podendo estar mais exposta a toxinas como absorção de co-poluentes (Hayes et al., 2015). Em estudos similares, a depuração de microplásticos em moluscos não ocorreu de maneira linear e diferentes tamanhos e formas de partículas podem apresentar distintas taxas de retenção e eliminação no trato digestivo (Song et al., 2019; Ward et al., 2022).

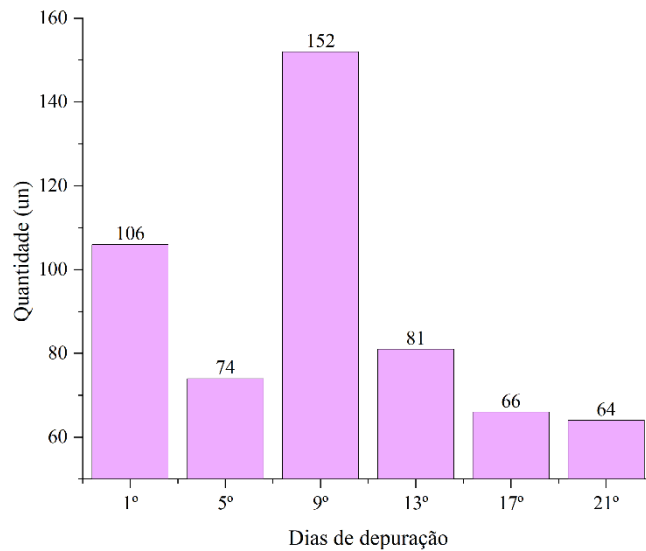


Figura 9 - Somatória dos particulados encontrados nas fezes de 24 indivíduos da espécie *Pomacea figulina*, durante o processo de depuração.

4.3.2 Morfologia e cores dos particulados

Ao longo do experimento, foram identificados diversos particulados. As Figuras 10 e 11 (A-I) apresentam uma diversidade morfológica e cromática representativa de fibras e fragmentos observados durante o período de depuração. Esses achados sugerem diversas fontes potenciais de poluição atuantes no rio. Além disso, foram observados sinais de degradação, especialmente nas bordas laterais arestadas dos particulados (Figs. 10 e 11), que indicam a possível exposição aos fatores abióticos associados a intemperização.

As fibras apresentaram variações quanto ao grau de torção (Fig. 10 A-I). Este fenômeno pode estar relacionado a ação da rádula que é uma estrutura composta por quitina formada por conjunto de dentes centrais e laterais que apresentam formas triangulares, longas e pontas agudas (Fig. 12 A-E). Por meio de rotações circulares trituram o alimento e direciona para tubo digestivo (Martín; Negrete, 2007). Diante disso, a presença de torções nas fibras pode estar associada tanto com os processos de digestão do animal, quanto à eliminação por outros organismos ou ação do ambiente (Rahman, 2025).

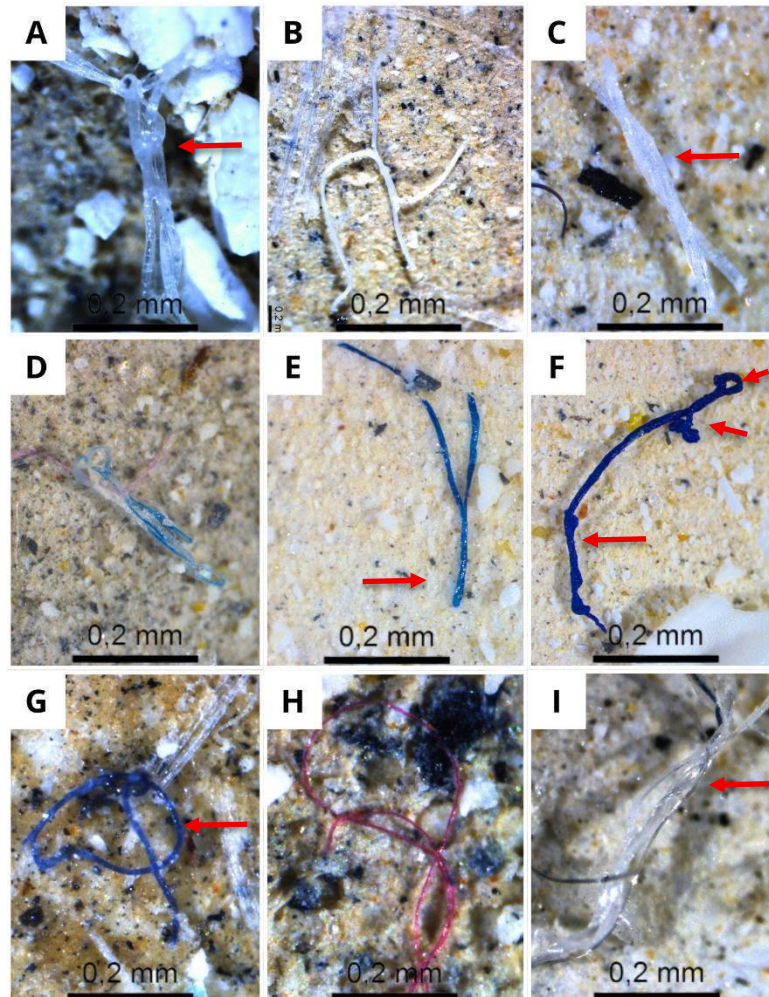


Figura 10. Representação de diferentes particulados caracterizados como fibras encontrados nas fezes retiradas em todo processo de depuração. (24 indivíduos).

Em relação aos fragmentos, foi observado uma diversidade morfológica, incluindo bordas irregulares (Fig.11 A-I), translucidez (Fig. 11 D), formas complexas (Fig.11 I) e laminares (Fig. 11 F). Essa diversidade sugere múltiplas origens e distintos processos de formação e degradação. Ademais, foram identificadas partículas esferas, embora em número reduzido quando comparado às fibras e fragmentos, apresentando igualmente uma diversidade de coloração.

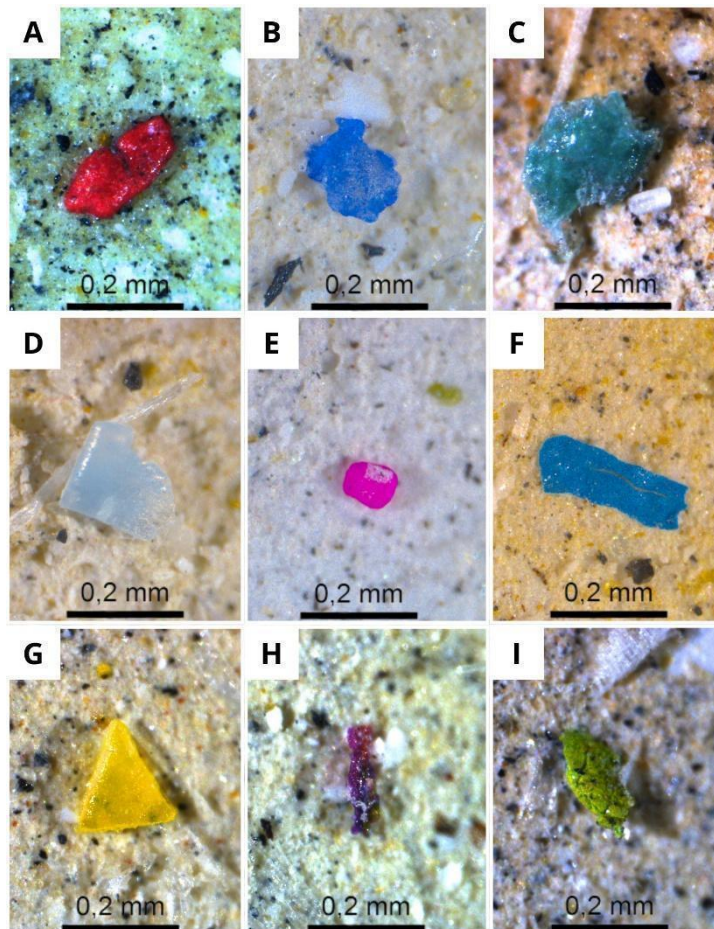


Figura 11. Representação de diferentes particulados caracterizados como fragmentos encontrados nas fezes retiradas em todo processo de depuração. (24 indivíduos).

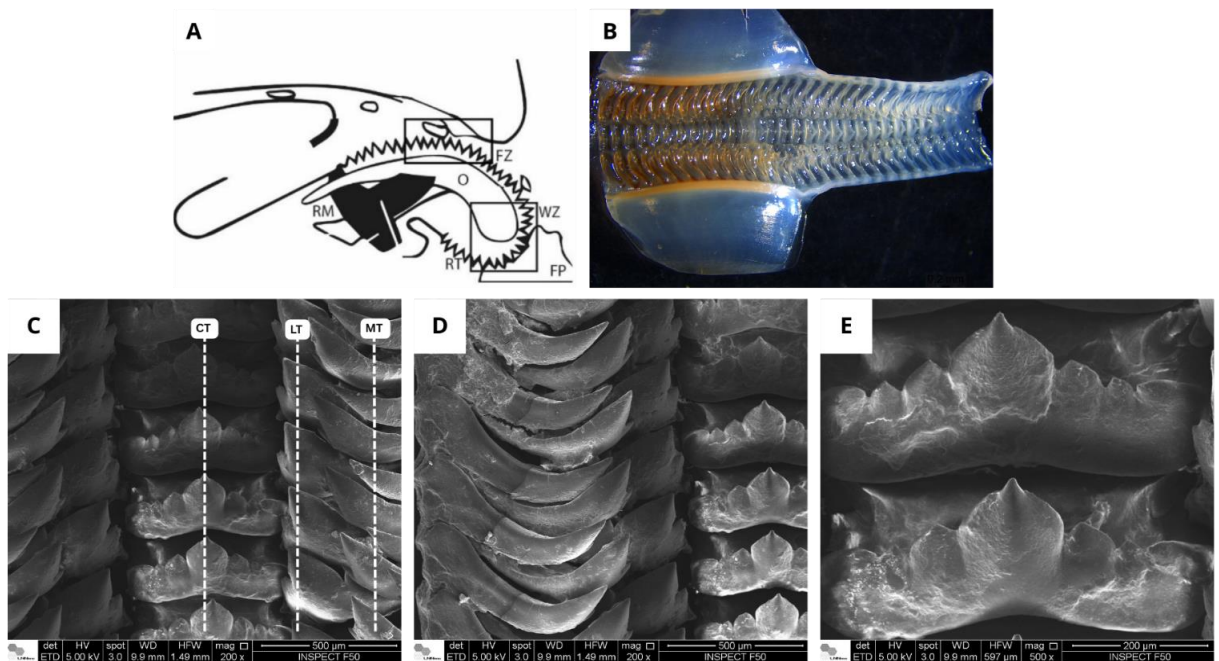


Figura 12. Fotografias da rádula de um indivíduo da espécie *Pomacea figulina*. A. Ilustração exemplificando o método que realizado a estrutura da rádula no processo de alimentação (Krings et al., 2021). B. Fotografia retirada pelo estereomicroscópio na magnificação de 1mm. C. Fotografia adquirida pelo microscópico eletrônico de varredura (MEV) na magnificação 200x. D. Fotografia dos dentes laterais adquirida pelo microscópico eletrônico de varredura (MEV) na magnificação 200x. E. Fotografia dos dentes centrais adquirida pelo microscópico eletrônico de varredura (MEV) na magnificação 500x. CT: dente central, FP: partícula alimentar, FZ: zona de formação, LT: dente lateral, O: odontóforo, MT: dente marginal, RM: músculos radulares, RT: dentes radulares, WZ: zona de trabalho.

No processo de digestão em relação ao tempo foram encontrados no total 537 particulados, conforme apresentado na Figura 13, as fibras correspondem a 61%, demonstrando uma elevada ocorrência de fonte de poluição doméstica, principalmente a partir de resíduos de tecidos sintéticos, linhas de pesca e viscosa. Assim, os organismos tornam-se suscetíveis a esse tipo de material devido à sua ampla disponibilidade no meio aquático (Jitkaew et al., 2023, Rahman, 2025).

Em relação à distribuição das cores nas fibras encontradas, também apresentada na Figura 13, verificou-se predominância da cor azul, seguido do preto. Foram identificadas diversas colorações, como: vermelho, amarelo, pink, branco, cinza, marrom, verde, laranja e roxo. Este resultado apresentou semelhança aos estudos marinhos, demonstrando que mesmo em ambientes de água doce, há influência de efluentes domésticos não tratado devido o descarte inadequado, sobretudo pela liberação de fibras têxteis de diferentes cores (Wang et al., 2021).

Os fragmentos apresentaram 28% dos particulados, sendo o segundo mais abundante nas amostras (Fig. 13). Também, apresentou a predominância na cor azul, além das cores amarela e rosa, possivelmente associadas a fontes específicas de poluição da região estudada, por exemplo, tecidos sintéticos, parte plásticas de carros, sapatos e tinta.

Outros tipos de microplásticos foram registrados em menores proporções, sendo elas: espuma (3,60%), esferas (3,40%), pellets (2,81%) e borracha (0,19%) (Fig.9). Este resultado pode estar associado à disponibilidade desses materiais nos ambientes de coleta ou uma possível seletividade alimentar do organismo durante o processo de ingestão (Hayes et al., 2015).

Nos particulados esféricos, a distribuição de cores não apresentou uma predominância, podendo ser uma característica de fontes pontuais de poluição, como resíduos de tintas provenientes de oficinas de pintura de automóveis e motocicletas realizadas pelo proprietário da chácara onde as coletas foram realizadas.

Espécies do gênero *Pomacea* demonstram seletividade alimentar ao serem expostas a plantas com diferentes valores nutricionais (Hayes et al., 2015). Contudo, ainda não há estudos que confirmem a possibilidade de seleção de microplásticos por gastrópodes, tampouco se a cor desses polímeros poderia influenciar tal processo seletivo.

Em estudos sobre ambientes aquáticos, fibras e fragmentos se destacam como os tipos de microplásticos mais frequentemente relatados, com predomínio das cores azul, preto e transparente (Wang et al., 2021). Os resultados obtidos demonstraram que há um indício de padrão de fontes de contaminação no rio Pirajibu-Mirim, observado a partir da eliminação da *P. figulina*. Podendo abordar o descarte inadequado de efluentes, principalmente domésticos e não tratados.

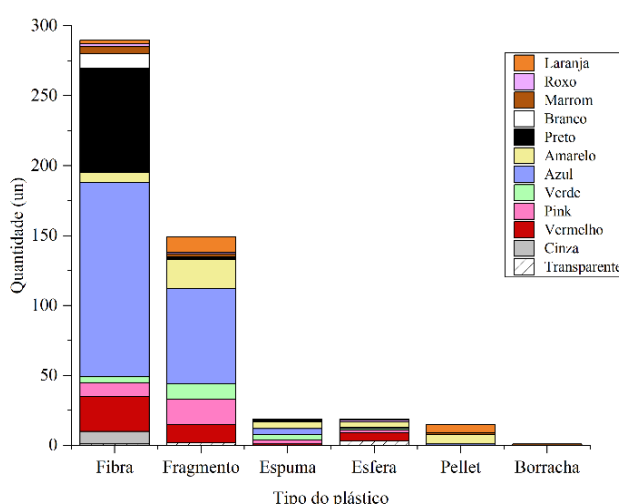


Figura 13. Gráfico de colunas empilhadas representando a distribuição de cores e quantidade de microplásticos por tipo (Fibra, Fragmento, Espuma, Esfera, Pellet e Borracha).

4.3.3 Distribuição de tamanho das fibras e fragmentos

Durante o período de depuração, analisou-se a distribuição de tamanho das fibras e fragmentos eliminados pelos indivíduos de *P. figulina*. Nos primeiros dias (0 a 8º dias), ambos os tipos de microplásticos (Fig. 14 e 15) apresentaram faixas de tamanho mais amplas, indicando a eliminação de partículas maiores na fase inicial.

Entre os dias 12 e 16, observou-se um aumento na faixa de tamanho tanto para as fibras (Fig. 14) quanto para os fragmentos (Fig. 15), sugerindo uma eliminação tardia de partículas maiores ou mais resistentes e a presença de um processo de depuração descontínuo. No período

entre os dias 16° e 24°, ambos os tipos apresentaram uma redução no tamanho médio e um estreitamento da distribuição de tamanho, indicando a predominância de MPs menores ao longo do tempo.

Embora apresentassem padrões temporais semelhantes, houve uma diferença significativa nos testes estatísticos ($p < 0,05$). Entre as fibras (Fig. 14), observou-se uma diferença entre os grupos de tamanho encontrados no início (0 a 8° dias) e na fase final (16° a 24° dias) do experimento. A redução de tamanho observada pode estar relacionada à fragmentação mecânica no trato digestivo ou à retenção prolongada de partículas menores. Em relação aos fragmentos (Fig. 15), houve diferença significativa apenas no último grupo (20 a 24 dias) durante o período de depuração.

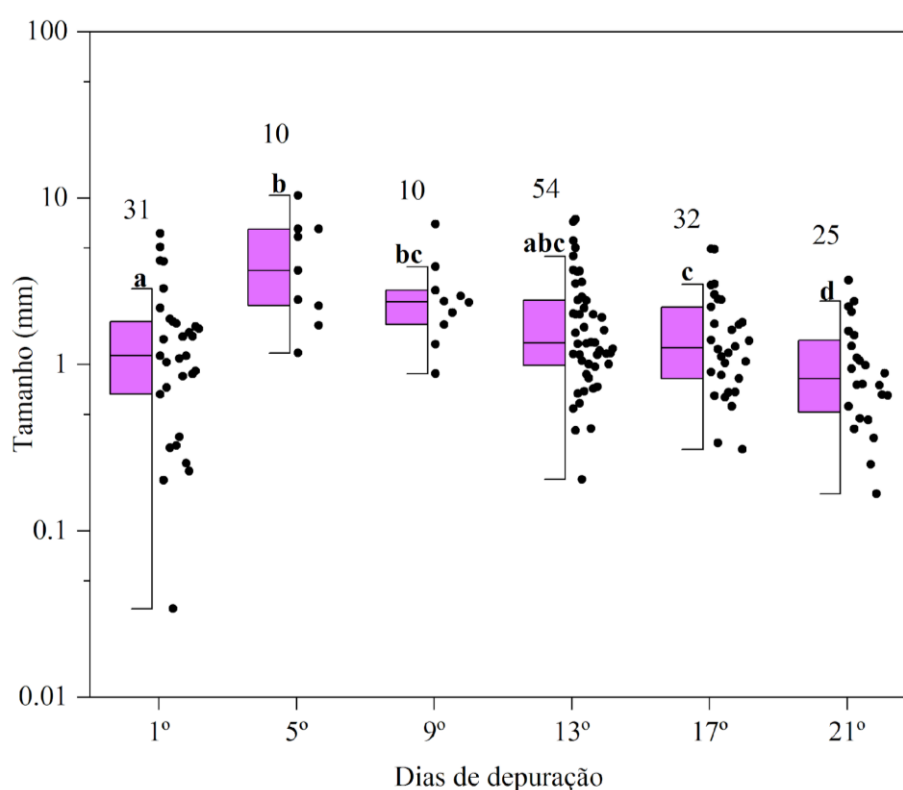


Figura 14. Distribuição de tamanho dos particulados caracterizados como fibra, encontrados nas fezes da *Pomacea figulina* (n=24) por data de coleta.

Considerando que o sistema digestório de gastrópodes apresenta estruturas para a degradação de polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, é possível que esses mecanismos também favoreçam processos de fragmentação das fibras ingeridas. Ademais, estas enzimas não sejam especificamente direcionadas à degradação de polímeros sintéticos, sua atuação pode

contribuir indiretamente para possíveis alterações físicas e químicas desses particulados. Como relatados em *Achatina fulica*, na qual fibras de PET foram excretadas em até 48 h, apresentando sinais de deterioração durante o trânsito digestivo (Song et al., 2019). Estudos com ostras (*Crassostrea virginica*) demonstraram que a depuração de fibras segue um modelo de dois compartimentos, apresentando fase rápida, onde os particulados maiores são liberados inicialmente e fase lenta com particulados menores, portanto, um processo não linear (Ward et al., 2022).

Apesar disso, observa-se que os intervalos de tamanho entre as fibras e os fragmentos identificados são distintos, o que sugere indícios de uma seletividade na capacidade da *Pomacea figulina* de ingerir diferentes tipos de polímeros. É uma lacuna a ser explorada, principalmente para utilização deste organismo como bioindicador de uma área.

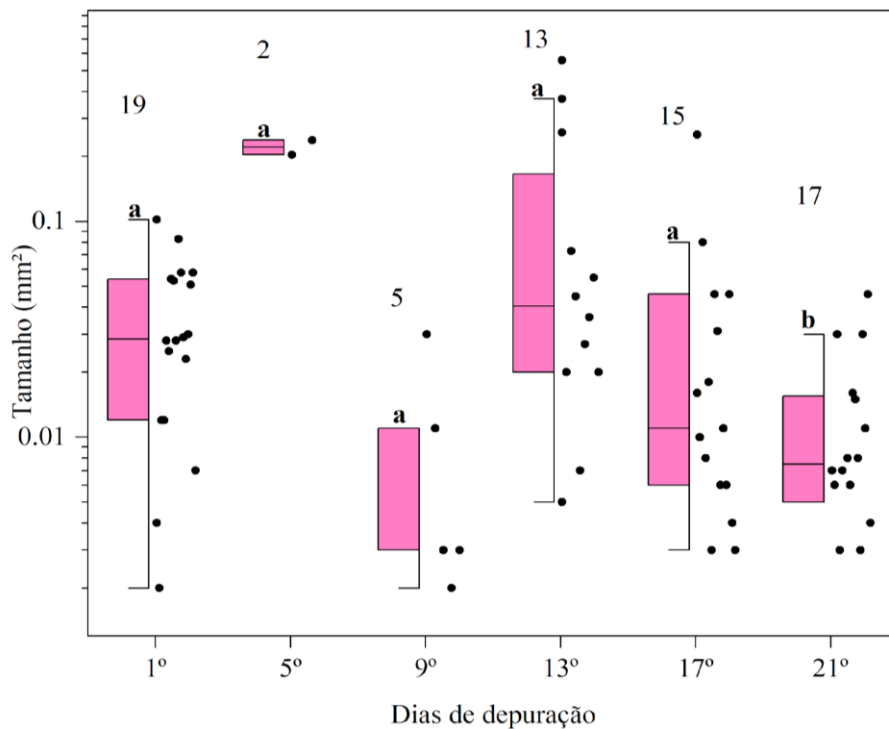


Figura 15. Distribuição de tamanho dos particulados que caracterizam como fragmentos, encontrados nas fezes da *Pomacea figulina* (n=24) por data de coleta.

4.3.5 Composição química dos particulados

Dentre todos os particulados encontrados nas fezes durante o processo de depuração, o μ FTIR identificou 338 microplásticos, porém o equipamento demonstrou uma limitação quanto a análise de polímeros em fibras, segmentando-as e tratando como particulado individual (Fig. 16 A-F). Observou-se a predominância do polietileno tereftalato (PET) que apresenta 32,4 % do total, seguido pelo copolímero de etileno-acetato de vinila (EVAc), com 19,8%, e pelo polietileno (PE), representando 15,6% das partículas identificadas (Fig. 17).

A presença do PET reforça a identificação de possíveis origens da poluição plástica, uma vez que polietileno tereftalato apresentou a maior abundância entre os tipos detectados. Segundo Geyer et al. (2017), grande parte do PET produzido encontra-se na forma de fibra de poliéster, as quais correspondem a 70% da produção total. Suas aplicações estão associadas à produção têxtil, além do uso em componentes eletrônicos e determinadas partes da construção de automóveis. Em função desse emprego e de persistência ambiental, o PET é um dos polímeros presentes no meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos, solos e sedimentos, apresentando como hotspot a região do rio Pirajibu-Mirim (Gerolin et al., 2024; Khatiwada et al., 2023).

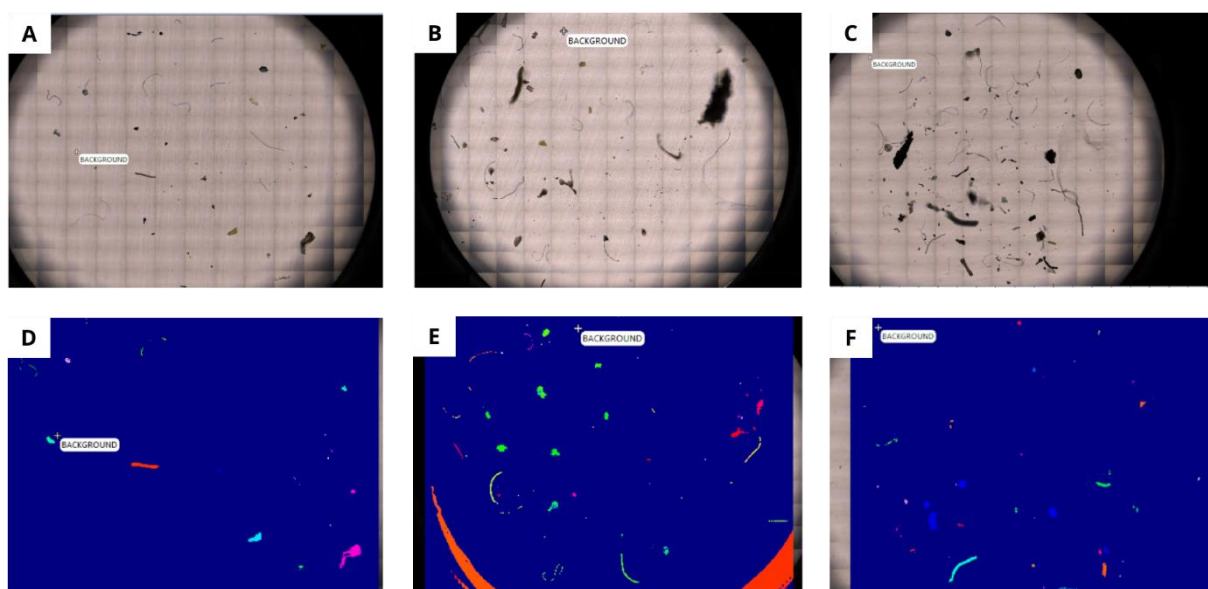


Figura 16. Fotografias das membranas utilizadas nas análises do μ FTIR Lumos II. A -C. Membranas com as amostras dispersas fotografadas pelo equipamento. D- F. Fotografias do Thresholds das membranas com coeficiente de Pearson (r) = 700.

O copolímero de etileno-acetato de vinila (EVAc), embora tenha apresentado a segunda maior abundância nas fezes durante o processo de depuração, ainda é pouco abordado de forma específica na literatura. Neste contexto, em estudos que avaliaram a composição dos polímeros presentes nas brânquias e trato intestinal de bivalves da espécie *Anodonta cygnea*, verificou-se que os polímeros predominantes foram polipropileno (PP), polietileno (PE) e polietileno tereftalato (PET) (Berglund et al., 2019). Entretanto, o EVAc também foi identificado nos tecidos analisados, embora em baixa proporção quando comparado com demais polímeros. O EVAc é um polímero que possui aplicações flexíveis, amplamente empregado na fabricação de calçados, filmes, embalagens, materiais esportivos e materiais farmacêuticos, o que indica a existência de diversas fontes de contaminação, possivelmente associadas ao descarte inadequado desses materiais em ambientes fluviais.

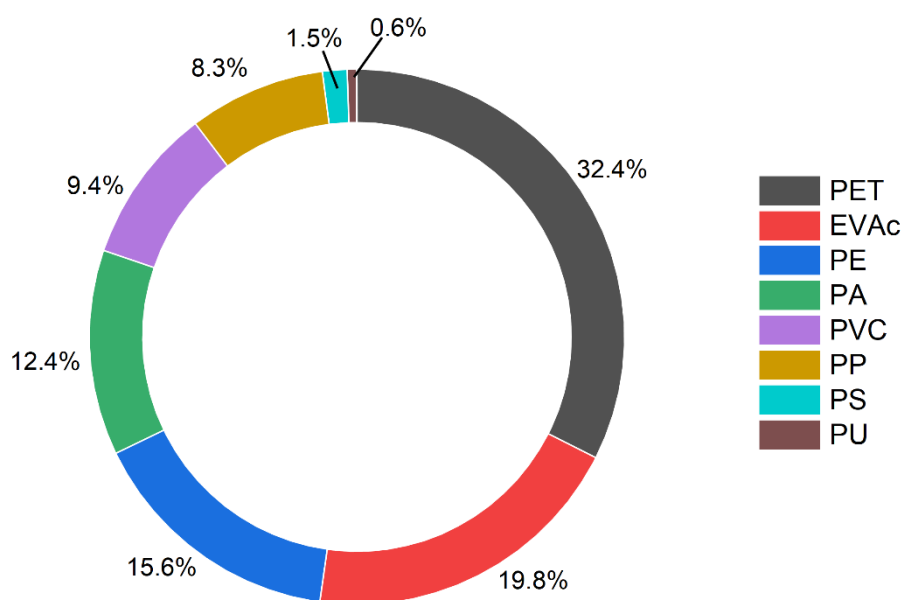


Figura 17. Relação dos tipos de plásticos caracterizado pela biblioteca de microplástico incluída no μ FTIR Lumos II.

Entre os polímeros identificados, o polietileno (PE) é um dos mais produzidos globalmente, empregado nas produções de embalagens descartáveis, sacolas, filmes agrícolas, favorecendo maior liberação no ambiente. Em ambientes de água doce, o PE é frequentemente detectado em sedimentos, água e biota, sendo mais predominante em estudos de invertebrados aquáticos (Alomar et al., 2021; Jolaosho et al., 2025). Sua ampla aplicação em diferentes

produtos reforça a existência de diversas fontes de contaminação plástica nos sistemas fluviais, contribuindo para sua elevada ocorrência ambiental.

4.4 CONCLUSÕES

A análise do processo de depuração em *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) apresentou uma alta concentração de microplásticos de fontes mistas, sendo identificados no rio Pirajibu-Mirim. Foram identificadas distintas formas e colorações de microplásticos, com a predominância de fibras e fragmentos. Os resultados indicam que a eliminação dos microplásticos não ocorre de maneira uniforme, partículas de maior tamanho foram eliminadas nos primeiros dias (0 a 8º dia), enquanto as menores permanecem por mais tempo nos dias 16º e 24º, promovendo variações na quantidade e sugerindo retenção temporária destas partículas no trato digestório do organismo. A avaliação μ FTIR das partículas eliminadas apontou possíveis fontes de contaminação no rio, destacando polímeros como PET, EVAc e PE. Esses achados reforçam o potencial de *P. figulina* como bioindicador da presença de microplásticos em ambientes dulcícolas e evidenciam impactos temporais da contaminação plástica na biota local.

4.6 REFERÊNCIAS

- ALOMAR, Carme; SANZ-MARTÍN, Marina; COMPA, Montserrat; RIOS-FUSTER, Beatriz; ÁLVAREZ, Elvira; RIPOLLES, Vincent; VALENCIA, José María; DEUDERO, Salud. Microplastic ingestion in reared aquaculture fish: biological responses to low-density polyethylene controlled diets in *sparus aurata*. **Environmental Pollution**, v. 280, p. 116960, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116960>.
- BERGLUND, E.; FOGELBERG, V.; NILSSON, P.A.; HOLLANDER, J.. Microplastics in a freshwater mussel (*Anodonta anatina*) in Northern Europe. **Science Of The Total Environment**, v. 697, p. 134192, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134192>.
- GAYLARDE, Christine; BAPTISTA-NETO, Jose Antonio; DA FONSECA, Estefan Monteiro. Plastic microfibre pollution: how important is clothes' laundering? **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07105, maio 2021.
- GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 7 jul. 2017.
- GEROLIN, Cristiano Rezende; ZORNIO, Bruno; PATARO, Luciana Foltram; LABUTO, Geórgia; SEMENSATTO, Décio. Microplastic pollution responses to spatial and seasonal variations and water level management in a polymictic tropical reservoir (São Paulo, Brazil). **Environmental Science And Pollution Research**, v. 31, n. 29, p. 42388-42405, 14 jun. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-024-33960-0>.

HAYES, Kenneth A. *et al.* Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 58, n. 1–2, p. 245–302, abr. 2015.

JITKAEW, Preyanuch *et al.* Occurrence of microplastics in freshwater gastropods from a tropical river U-Taphao, southern Thailand. **PeerJ**, v. 11, p. e14861, 8 fev. 2023.

JOLAOSHO, Toheeb Lekan; RASAQ, Mariam Folashade; OMOTOYE, Eniola Victoria; ARAOMO, Oluwadamilola Victoria; ADEKOYA, Opeyemi Shakirat; ABOLAJI, Opeyemi Yusuf; HUNGBO, Jesuyon Joseph. Microplastics in freshwater and marine ecosystems: occurrence, characterization, sources, distribution dynamics, fate, transport processes, potential mitigation strategies, and policy interventions. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 294, p. 118036, abr. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118036>.

KHATIWADA, Janak Raj; MADSEN, Caris; WARWICK, Colin; SHRESTHA, Sarita; CHIO, Chonlong; QIN, Wensheng. Interaction between polyethylene terephthalate (PET) microplastic and microalgae (*Scenedesmus* spp.): effect on the growth, chlorophyll content, and hetero-aggregation. **Environmental Advances**, v. 13, p. 100399, out. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100399>.

KINJO, Azusa *et al.* Size-dependent elimination of ingested microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110512, dez. 2019.

KRINGS, Wencke; NEIBER, Marco T.; KOVALEV, Alexander; GORB, Stanislav N.; GLAUBRECHT, Matthias. Trophic specialisation reflected by radular tooth material properties in an “ancient” Lake Tanganyikan gastropod species flock. **Bmc Ecology And Evolution**, v. 21, n. 1, p. 1-25, 3 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-021-01754-4>.

LI, Yubo *et al.* Microplastics in surface water and sediments of Chongming Island in the Yangtze Estuary, China. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, p. 15, dez. 2020.

LOPES, Daiane Pinheiro. **Efeitos da contaminação por microplásticos na biomineralização do gastrópode *Pomacea canaliculata***. 2022. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2022. Disponível em: <https://repositorio.furg.br/handle/123456789/11969>. Acesso em: 04 jul. 2025.

MARKLEY, L. A. T. *et al.* **Guía para la identificación y clasificación visual de partículas de plástico**. DOI:10.13140/RG.2.2.22628.76166, 2024. Traducción de la versión 1: Enero 2024. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Laura-Markley-4>.

MARTÍN, Sm; NEGRETE, Lhl. Radular ultrastructure of South American Ampullariidae (Gastropoda Prosobranchia). **Brazilian Journal Of Biology**, v. 67, n. 4, p. 721-726, nov. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842007000400019>.

RAHMAN, Mahfuzur *et al.* Quantification and characterization of microplastics in an intertidal gastropod the common periwinkle *Littorina littorea*. **Water Biology and Security**, p. 100401, mar. 2025.

ROCHMAN, Chelsea M. *et al.* Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703–711, 1 abr. 2019.

RODRIGUES, Cândido Carvalho; SALLA, Raquel Fernanda; ROCHA, Thiago Lopes. Bioaccumulation and ecotoxicological impact of micro(nano)plastics in aquatic and land snails: Historical review, current research and emerging trends. **Journal of Hazardous Materials**, v. 444, p. 130382, fev. 2023.

SONG, Yang *et al.* Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 447–455, jul. 2019.

SEUFFERT, M.; Martín, P. R. Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullaridae) reared at different constant temperatures. **SpringerPlus**, v. 2, p. 312, 2013.

TALLARICO, Lenita De Freitas. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America *. **American Malacological Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 330–336, jan. 2016.

VENDRAMINI, Bianca Medeiros; DE ARRUDA, Eliane Pintor. Freshwater mollusk species of Itupararanga Reservoir, São Paulo, Brazil. [*S.d.*].

WANG, Ting *et al.* Microplastic accumulation via trophic transfer: Can a predatory crab counter the adverse effects of microplastics by body defence? **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142099, fev. 2021.

WARD, Royall McMahon *et al.* Microplastic transfer from the American horseshoe crab to shorebirds through consumption of horseshoe crab eggs in Jamaica Bay, NY. **Marine Pollution Bulletin**, v. 184, p. 114148, nov. 2022.

5. CAPÍTULO 4 - ARTIGO 3

Microplásticos em trânsito: padrões de eliminação e retenção de microplásticos de polietileno filme em *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827)

Microplastics in transit: patterns of elimination and retention of polyethylene film microplastics in *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827)

Natalia Woppe ^{1,2,3}, Eliane Pintor de Arruda ², Walter Ruggeri Waldman¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), Centro de Ciência e Tecnologia (CCTS), Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

²Grupo de Pesquisa em Poluição Plástica - Universidade Federal de São Carlos/Campus Sorocaba.

³Laboratório de Estudos em Macroinvertebrados Bentônicos - Universidade Federal de São Carlos/Campus Sorocaba.

RESUMO

A poluição por microplásticos representa uma preocupação ambiental de caráter global, devido à sua persistência e aos potenciais impactos ecotoxicológicos sobre organismos aquáticos. Este estudo investigou os processos de ingestão, eliminação e bioacumulação de microplásticos de polietileno pelo gastrópode de água doce *Pomacea figulina*, considerando a possível influência da concentração e do tamanho das partículas na dinâmica de digestão e no acúmulo em órgãos internos. Foram coletados 18 espécimes de *P. figulina* no rio Pirajibu-Mirim (23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W), localizado em Sorocaba, São Paulo – Brasil, e distribuídos em três grupos experimentais: controle (sem microplásticos), tratamento 1 (ração com 20% de microplásticos) e tratamento 2 (ração com 10% de microplásticos). O experimento foi realizado ao longo de 41 dias, com a quantificação e mensuração morfológica das partículas eliminadas. Ambos os tratamentos apresentaram eliminações mais acentuadas nos primeiros dias após a digestão, diferenciando-se ao final do experimento. Partículas menores foram predominantemente eliminadas nos primeiros dias, ao passo que fragmentos maiores permaneceram retidos por períodos mais longos, sugerindo um padrão de bioacumulação associado ao tamanho. Os microplásticos foram encontrados nos órgãos e apresentaram rugosidades em suas superfícies analisadas pelo microscópio de varredura (MEV). Os resultados evidenciam que *P. figulina* responde de forma diferenciada às concentrações e aos tamanhos dos microplásticos, destacando seu potencial como bioindicador em ecossistemas de água doce.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Gastropoda; Polietileno; Modelos experimentais.

5.1 INTRODUÇÃO

Microplásticos (MPs) têm se consolidado como poluente emergente em função da sua persistência e potencial para causar impactos ecotoxicológicos em organismos aquáticos (Rochman et al., 2019; Li et al., 2020). Entre os diferentes polímeros que compõem esses contaminantes, o polietileno (PE) se destaca como um dos mais produzidos e descartados globalmente, estando frequentemente associado a embalagens plásticas descartáveis e resíduos urbanos (Geyer; Jambeck; Law, 2017). Sua ampla utilização e baixa degradabilidade favorecem a acumulação em ecossistemas aquáticos, incluindo ambientes lóticos, onde podem ser ingeridos por diferentes níveis da cadeia trófica.

Os mecanismos de ingestão, excreção e retenção de MPs em organismos aquáticos têm sido amplamente estudados, revelando que fatores como concentração, tamanho e morfologia das partículas influenciam diretamente a dinâmica no trato digestivo e a potencial retenção em órgãos internos (Rahman et al., 2025; Rodrigues; Salla; Rocha, 2023; Tallarico, 2016). Nesse contexto, os gastrópodes dulcícolas têm se mostrado modelos experimentais adequados por sua ampla distribuição, hábitos alimentares generalistas e fácil manutenção em laboratório (Tallarico; Miyasato; Nakano, 2016).

A espécie *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827), apesar de pouco explorada em estudos ecotoxicológicos, apresenta características fisiológicas e ecológicas que a tornam promissora para o monitoramento da poluição por microplásticos (Vendramini e Arruda, 2022). O processo de digestão, caracterizado pela eliminação gradual das partículas ingeridas, possibilita a avaliação do tempo de trânsito intestinal e da retenção de MPs em tecidos, fornecendo informações cruciais sobre a bioacumulação e potenciais riscos ecotoxicológicos associados à exposição prolongada.

Nessa circunstância, avaliou-se se existe diferença no tempo de trânsito entre classes de tamanho, considerando possíveis variações na velocidade de eliminação e bioacumulação. Este estudo teve como objetivo principal analisar a ingestão, eliminação e retenção de microplásticos de polietileno pelo gastrópode dulcícola *Pomacea figulina*, explorando como a concentração e o tamanho das partículas influenciam a dinâmica de depuração e o acúmulo em órgãos internos. Especificamente, buscou-se: (i) quantificar a eliminação dos MPs durante o período de depuração e observar a variação temporal entre os tratamentos; (ii) investigar a influência do tamanho das partículas na eliminação, diferenciando a taxa de excreção entre fragmentos menores e maiores; e (iii) determinar a bioacumulação e distribuição dos MPs em órgãos

internos: brânquias, pulmões, intestino, glândula digestiva e vísceras (sistema reprodutor, estômago, rins, boca, sistema nervoso) ao final do experimento.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Coleta e Transporte

Foram coletados no dia 24 de fevereiro de 2025, 18 indivíduos adultos do gastrópode *Pomacea figulina* em um trecho do rio Pirajibu-Mirim (23°29'24.2"S; 47°23'06.3"W), localizado no bairro Brigadeiro Tobias, município de Sorocaba, estado de São Paulo, Brasil. A coleta foi realizada aleatoriamente ao longo das margens do rio. Os organismos foram acondicionados em recipientes com água do próprio ambiente e transportados até o laboratório de Fisiologia Animal e Comparada (LaFISC), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba.

5.3.2 Aclimação e grupos experimentais

No laboratório, os indivíduos foram pesados em balança digital Shimadzu AUY220 e medidos com paquímetro digital Zaas IP54 ($\pm 0,01$ mm), registrando massa e comprimento corporal. Depois, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos e mantidos em aquários individuais de 3 L contendo água decolorada filtrada por carvão ativado. A filtração usava um tubo de PVC com carvão, calcário, estopa e pedra porosa.

5.3.3 Depuração pré-exposição

Foi realizado um período de 21 dias de depuração pré-exposição, com o objetivo de eliminar eventuais particulados previamente ingeridos. Durante esse período, os animais foram alimentados com 0,5 g de uma ração elaborada em laboratório, conforme o anexo 3 - Tabela 1.

5.3.4 Caracterização dos microplásticos de polietileno

Para confecção dos microplásticos foram utilizadas sacolas de uso para decoração com a coloração amarela, e sua composição foi verificada a partir do FTIR (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) modelo The Cary 630 da marca Agilent, a análise pela técnica de amostragem (ATR) com número de 32 scans, na resolução 4 cm^{-1} .

5.3.5 Exposição

Os grupos experimentais foram assim definidos conforme a figura 18 A: Grupo Controle (sem adição de microplásticos), alimentação somente com a ração formulada, Tratamento 1 (ração formulada com 20% de microplásticos) e Tratamento 2 (ração formulada com 10% de

microplásticos). A proporção e o valor nutricional da ração formulada estão disponíveis no Anexo C - Tabela 1.

Os indivíduos receberam 1 g no total de ração correspondente ao tratamento (com ou sem microplásticos) e permaneceram expostos ao alimento por um período de 72 horas.

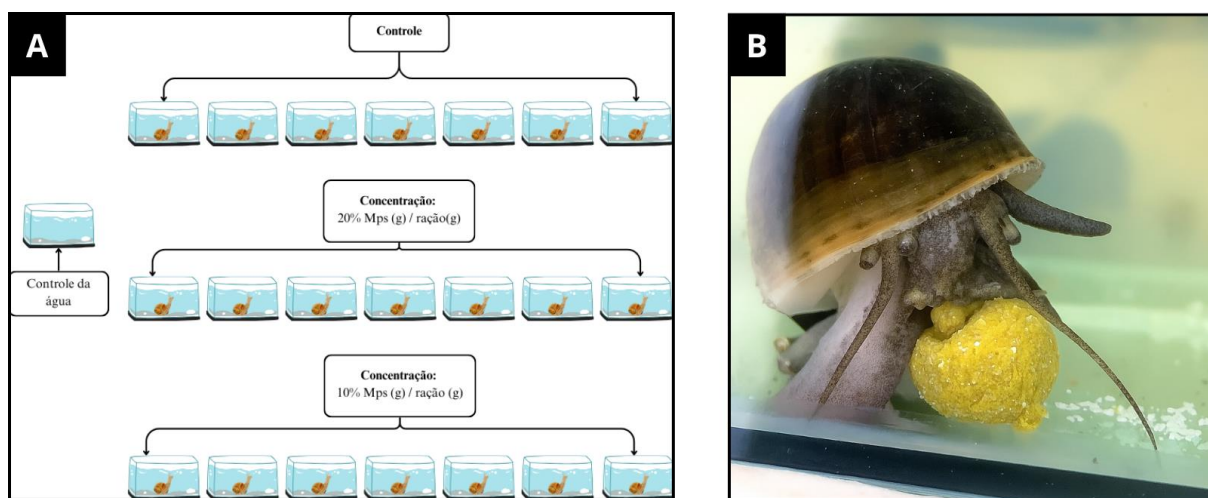


Figura 18. A. Disposição dos grupos de tratamento no laboratório de Fisiologia Animal e Comparada (LaFISC). B. Um indivíduo da espécie *Pomacea figulina* se alimentando da ração com adição de microplásticos.

5.3.6 Depuração pós-exposição

Após a exposição, realizou-se a limpeza dos aquários por sucção, com remoção completa dos sedimentos, procedimento efetuado a cada quatro dias. As fezes eliminadas foram peneiradas com uma malha de 0,005 mm², tratadas com 10 mL de peróxido de hidrogênio (30%) e filtradas em três etapas. O material foi então armazenado em estufa a 50 °C por 72 horas. As amostras foram filtradas a vácuo em sala controlada livre de plásticos, utilizando membranas de náilon com porosidade de 5 µm.

5.3.7 Contabilização dos microplásticos

Para quantificar os particulados eliminados, cinco pontos distintos foram definidos em cada membrana (Fig. 19 A). As amostras foram registradas por meio de câmera digital Leica (MC 170 HD), acoplada a estereomicroscópio (Leica S8AP0), com suporte do software (LAS v4.11). As imagens foram processadas no FIJI – Image J, empregando o plugin Trainable Weka Segmentation, que permitiu a classificação supervisionada das partículas em duas categorias: (1) microplásticos e (2) sombras/espacos vazios (Fig.19 C). Após a classificação, aplicou-se tratamento de threshold para mensuração automática, obtendo-se as variáveis área e quantidade de partículas (Fig.19 E).

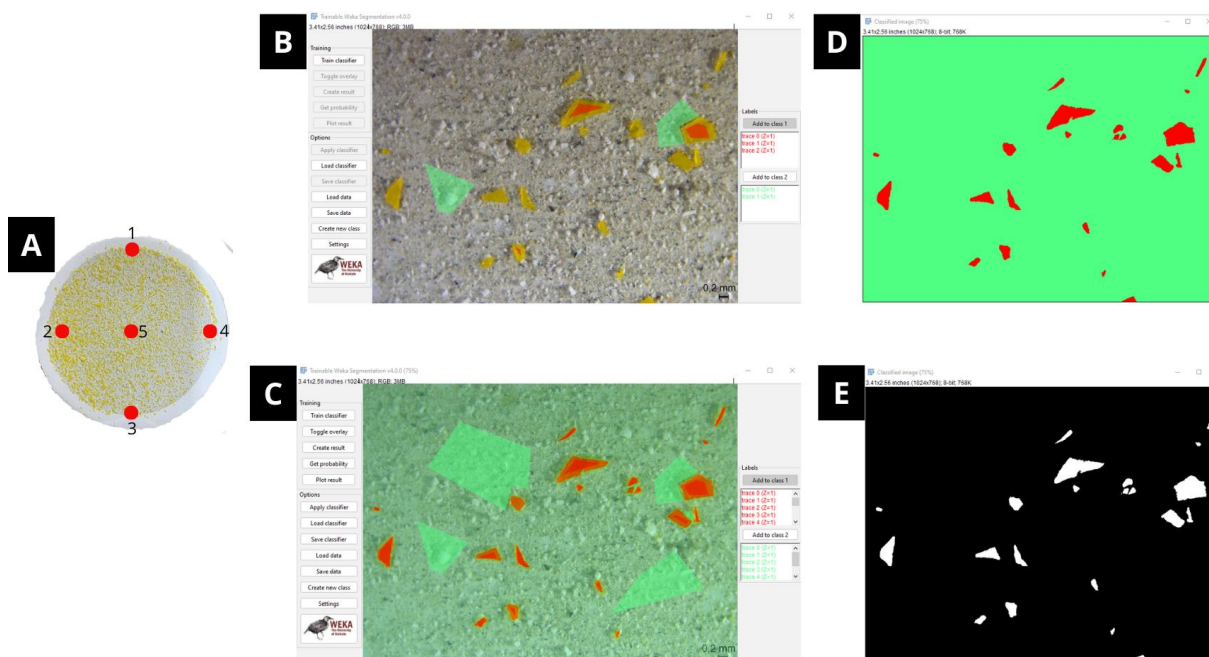


Figura 19. A. Membrana de náilon com as regiões selecionadas para contabilização dos microplásticos na cor vermelha. B. Captura de tela do software FIJI - Image J com plugin Trainable Weka Segmentation, na classificação dos objetos para ser mensurados: Classe 1- cor vermelha- objeto de interesse; Classe 2 - cor verde - objeto desprezado. C. Captura de tela do plugin após o machine learning identificar as classes impostas. D. Captura de tela do resultado gerado pelo software FIJI- Image J. E. Captura de tela do tratamento de threshold.

Após a contabilização foi calculado o percentual de eliminação de microplásticos dos indivíduos por tratamento, que se baseia na equação abaixo.

$$\text{Taxa de eliminação} = \frac{\text{Quantidade eliminada}}{\text{Quantidade ofertada}} * 100 \text{ (Equação 1)}$$

5.3.8 Eutanásia e processamento dos órgãos

Para realização da eutanásia, os indivíduos foram anestesiados com solução de mentol e cloreto de magnésio (10%) por 24 horas, após este período, houve a quebra da concha para retirada das partes moles. Em seguida, procedeu-se à dissecação e a retirada das seguintes estruturas: brânquias, pulmões, intestino, glândula digestiva e vísceras.

Os tecidos foram submetidos à digestão química com peróxido de hidrogênio (30%) e filtrados a vácuo em membranas de 5 µm. As membranas resultantes foram analisadas sob estereomicroscópio Leica S8AP0, acoplado à câmera Leica MC 170 HD, com captura de imagens via software LAS v4.11. Posteriormente, as imagens foram tratadas no FIJI – ImageJ,

permitindo a identificação e mensuração dos microplásticos presentes nos órgãos. Amostras de MPs encontrados no intestino e na glândula digestiva foram analisados no Microscópio de varredura (MEV) com intuito de observar a superfície dos particulados.

5.3.9 Análise Estatística

Os dados das dimensões dos particulados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Como não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre os grupos e, posteriormente, o teste de Dunn para análise post hoc com ajuste do p-valor para múltiplas comparações.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 Caracterização do polietileno ofertado

O polietileno foi escolhido por ser amplamente utilizado e presente em diversas aplicações, especialmente em sacolas plásticas. Para confirmar sua composição, realizou-se uma análise FTIR comparada ao banco OpenSpecy, identificando o grupo metileno (-CH₂-) entre 3.000 e 2.800 cm⁻¹, característico do polietileno (Cowger et al., 2025) (Fig. 20).

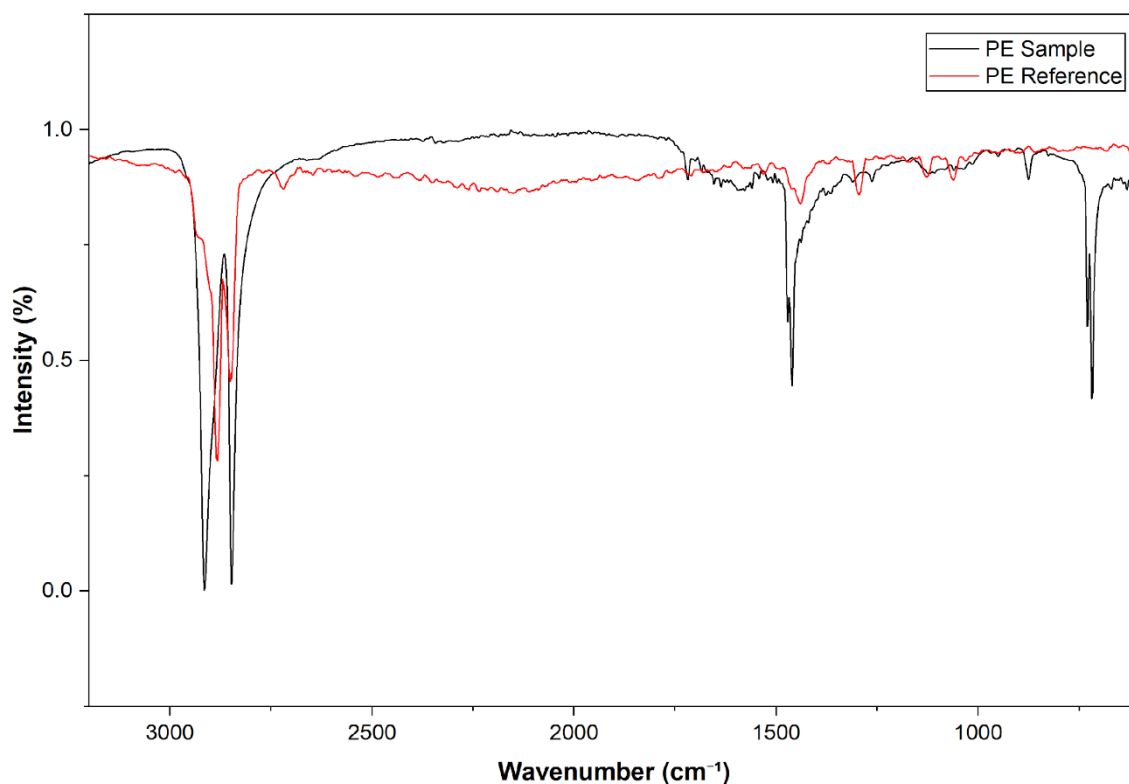


Figura 20. Espectro de FTIR da amostra da sacola (cor preta) e espectro de referência do polietileno (cor vermelha), obtido pelo OpenSpecy.

5.4.2 Quantidade de microplásticos

Durante o processo de depuração, *Pomacea figulina* apresentou uma diminuição geral na abundância de microplásticos em ambos os tratamentos até o 17º dia. Após esse período, foram observadas flutuações na quantidade de partículas (Fig. 21). Esse padrão pode estar associado a diferenças interindividuais no tempo de trânsito intestinal, na eficiência da depuração ou na ingestão contínua, uma vez que *P. figulina* não exhibe comportamento alimentar seletivo (Chae; An, 2020; Jeyavani et al., 2022; Xie et al., 2026).

No tratamento 1 (20% de MPs), altas concentrações foram registradas no trato digestivo durante os dias iniciais, com uma média de 1.038 ± 286 partículas no dia 1º. Do dia 13º ao 41º, observou-se uma redução gradual, sugerindo uma tendência ao equilíbrio do sistema. No entanto, as flutuações persistiram, possivelmente influenciadas pelo tamanho e forma das partículas, e um aumento secundário na contagem média de partículas (314 ± 153) foi observado no 41º. No Tratamento 2 (10% de MPs), também foram observadas variações na eliminação. Após o dia 21º (203 ± 147), ocorreu estabilização entre os dias 25º e 37º, com uma média final de 187 ± 88 partículas no dia 41º (Fig. 21).

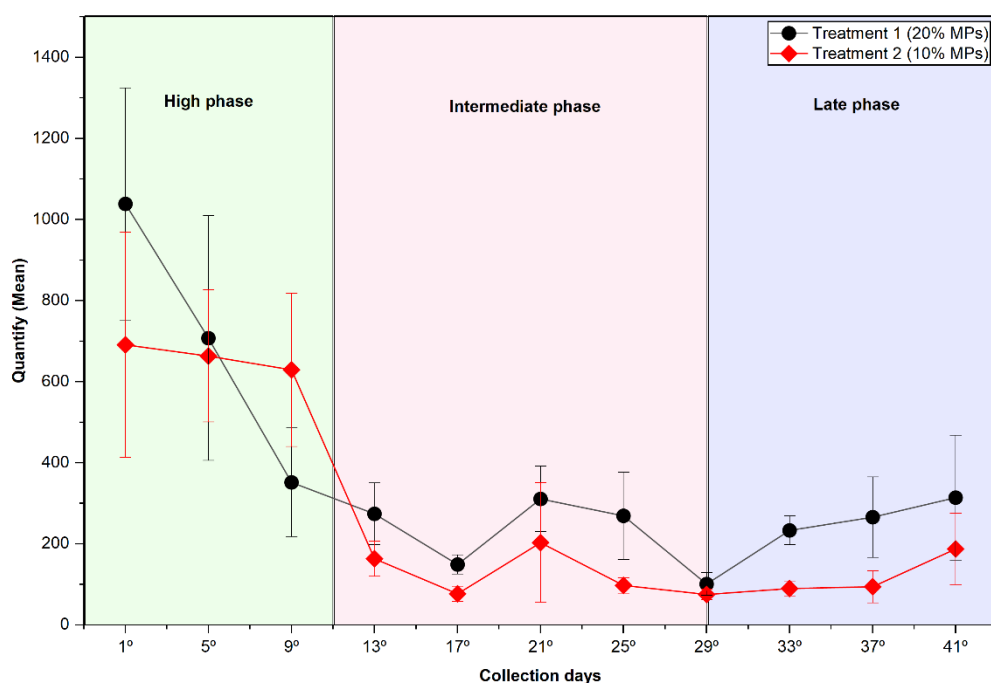


Figura 21. Média da quantidade de microplásticos de PE encontrados nas fezes de *P. figulina* nos diferentes dias de depuração para os dois tratamentos experimentais.

Ambos os tratamentos demonstraram reduções significativas na quantidade de microplásticos nos primeiros dias, conforme apresentado na Tabela 1 com o cálculo do

percentual, indicando uma eliminação inicial rápida: 17,82% no tratamento 1 (20% MPs) e 19,16% no tratamento 2 (10% MPs). A partir do 21º dia, verificou-se que o tratamento 1 apresentou variações mais acentuadas (6,53% - 2,42%) com níveis elevados de microplásticos. O tratamento 2 também apresentou oscilações; entretanto, no período final, evidenciou uma tendência de estabilização (4,58% - 2,14%), como apresentado na Tabela 1.

O cálculo da taxa de eliminação (Tabela 1) utilizou a quantidade ofertada, considerando que todas as porções oferecidas para os indivíduos apresentavam uma mistura homogênea. Portanto, as taxas apresentam uma visualização melhor das fases da depuração: uma fase de início de uma eliminação elevada (1º-9º dia), um período intermediário (13º-29º dia) indício de uma retenção temporária desses microplásticos e, por fim, uma fase tardia (33º-41º dia) pode ser a liberação dos microplásticos que foram retidos na fase anterior.

Tabela 1. Taxa de eliminação de MPs de PE ao longo dos dias pelos indivíduos de *P. figulina*.

Percentual de eliminação de MPs dos indivíduos por tratamento

Dias	Tratamento 1 (20% MPs)	Tratamento 2 (10% MPs)
1º	17,82%	17,12%
5º	17,50%	19,16%
9º	8,02%	18,09%
13º	6,63%	4,74%
17º	3,57%	2,23%
21º	7,36%	4,58%
25º	6,53%	2,86%
29º	2,42%	2,14%
33º	5,58%	2,56%
37º	5,62%	2,79%
41º	6,55%	5,28%

Os gastrópodes apresentam metabolismo relativamente lento e processo de depuração não linear, uma vez que são altamente sensíveis a variações de temperatura e pH, fatores que modulam diretamente sua taxa metabólica (Song et al., 2019; Ward et al., 2022). Além dos condicionantes ambientais, as taxas de ingestão e eliminação também variam em função de características morfológicas, especialmente o tamanho corporal, dado que há relação entre a área da secção transversal do intestino e a biomassa assimilada ao longo do desenvolvimento (Hayes et al., 2015; Tamburi; Martín, 2009). Ademais, o gênero constitui variável relevante

nesse processo: fêmeas de *Pomacea canaliculata* podem ingerir até 50% mais alimento que machos de mesmo tamanho corporal, diferença atribuída à maior dimensão da glândula do intestino médio nas fêmeas, o que amplia sua capacidade de processamento alimentar (Tamburi; Martín, 2012; Hayes et al., 2015; Koch et al., 2006).

Neste experimento, foram feitas medidas do comprimento e do peso dos indivíduos tanto no início quanto ao final do estudo. Considerando a média geral entre os tratamentos, observou-se discreta variação, com aumento do peso médio de 1,75 g para 0,18 g, enquanto o tamanho médio passou de 3,69 mm para 1,03 mm (Tabela 2). Entre os tratamentos, o tratamento 1 apresentou o maior ganho de peso (14,73 g), ao passo que o tratamento 2 registrou o maior incremento em comprimento, atingindo 12 mm durante o experimento. A superioridade do tratamento 2 quanto ao crescimento pode estar associada à composição sexual do grupo, possivelmente com maior proporção de fêmeas, as quais apresentam maior capacidade ingestiva e estruturas digestivas mais desenvolvidas, como a glândula do intestino médio, favorecendo maior assimilação de biomassa ao longo do tempo (Tabela 3). Não foi possível equilibrar o número de fêmeas entre os tratamentos antes da exposição, uma vez que a determinação sexual só é possível de ser realizada com a dissecação dos animais.

Tabela 2. Média do peso (gramas) e tamanho (milímetros) durante o início e o final do experimento.

	Médias dos pesos e tamanhos obtidas no início e final do experimento					
	Início: 24/02/25		Final: 22/05/25		Diferença (final - inicial)	
	Peso (g)	Tamanho (mm)	Peso (g)	Tamanho (mm)	Peso (g)	Tamanho (mm)
Controle	8,67	34,23	23,32	45,11	14,65	10,88
Tratamento 1 (20% MPs)	9,33	34,86	24,07	45,84	14,73	10,98
Tratamento 2 (10% MPs)	7,58	31,17	22,13	43,18	14,55	12,01

Tabela 3. Controle das mensurações de peso (gramas) e tamanho (milímetros) no início e no final do experimento.

Controle de peso e tamanho da *P. figulina* (Spix in Wagner, 1827)

Aquários	Início (24/02/2025)		Final (22/05/2025)		Sexo
	Peso (g)	Tamanho (mm)	Peso (g)	Tamanho (mm)	
CTR 1	8,9	32,34	23,1	44,96	Fêmea
CTR 2	12,3	38,75	18,2	42,54	Macho
CTR 3	5,8	29,35	24,5	45,37	Fêmea
CTR 4	14,2	38,28	19,9	44,19	Macho
CTR 5	5,4	27,82	24,8	45,77	Fêmea
CTR 6	5,4	38,84	29,4	47,85	Fêmea
TR1.1	9,5	35,21	22,8	44,14	Fêmea
TR1.2	7,6	32,01	24,1	44,63	Fêmea
TR1.3	13,4	39,83	20,6	41	Macho
TR1.4	9,6	35,83	28,1	51,5	Fêmea
TR1.5	9,2	35,12	27,9	47,79	Macho
TR1.6	6,7	31,17	20,9	45,99	Macho
TR 2.1	12,6	37,28	22,8	41,13	Fêmea
TR 2.2	10,5	35,12	23,3	44,4	Fêmea
TR 2.3	6,9	30,84	21,7	42,42	Macho
TR 2.4	6,9	31,02	25,1	45,71	Fêmea
TR 2.5	4,9	27,98	18,5	43,14	Macho
TR 2.6	3,7	24,75	21,4	42,27	Fêmea

5.4.3 Tamanho dos microplásticos

Os fragmentos excretados pelos indivíduos não apresentaram nenhuma evidência de fragmentação durante o processo digestivo, porém exibiram diferenças no padrão temporal de eliminação de acordo com o tamanho e a quantidade (Fig.22). O anexo C – Figuras 2 - 6 apresentam histogramas detalhando o tamanho por dia de coleta.

Em ambos os tratamentos, os microplásticos que apresentam tamanhos menores foram eliminados predominantemente nos primeiros dias de depuração, enquanto fragmentos maiores permaneceram por mais tempo no trato digestivo, sendo excretados de forma mais tardia. Esse comportamento, mostra indícios de um tempo de trânsito diferenciado entre classes de tamanho, com eliminação mais rápida das partículas pequenas e retenção temporária das maiores. A literatura apresenta que estudos em outros moluscos, como *Mytilus galloprovincialis*, partículas menores foram excretadas em curto tempo quando comparado com as partículas maiores, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (Kinjo et al., 2019).

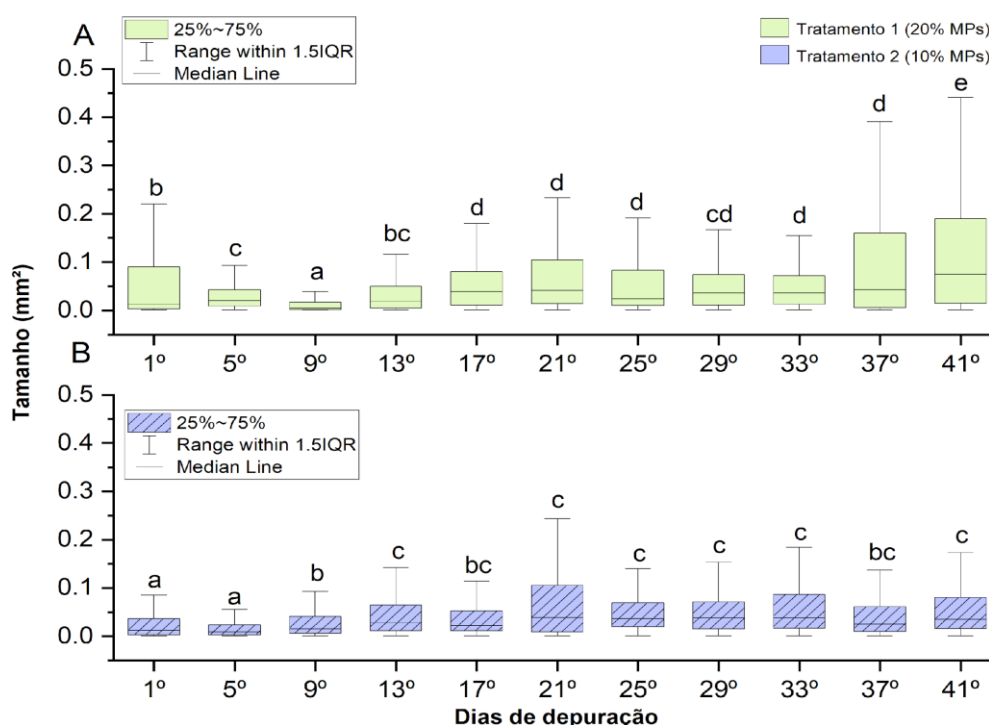


Figura 22. Distribuição do tamanho das partículas eliminadas ao longo dos dias de depuração. A. Tratamento 1 (20% MPs). B. Tratamento 2 (10% MPs).

Os resultados demonstraram que *Pomacea figulina* possivelmente apresenta um comportamento de eliminação de fragmentos, no qual, a faixa de tamanho que foi ofertada dos fragmentos interferiram em seu tempo de trânsito no trato digestivo do animal.

5.4.4 Microplásticos nos órgãos

Foram encontradas no total 144 partículas de microplásticos nos órgãos selecionados, como apresentado na Figura 23. O órgão que apresentou a maior quantidade foi o intestino em ambos os tratamentos, apresentando 97% de particulados no tratamento 1 e no tratamento 2 foram encontrados 95% de particulados. Como demonstrado na figura 21, os indivíduos não depuraram todos os particulados ofertados, ou seja, era esperado particulados no trato digestório após 41º dia de depuração. Além disso, os microplásticos encontrados no intestino demonstraram intervalo de tamanho e quantidade semelhante aos encontrados no processo de depuração, com destaque no tratamento 2 que mostra uma distribuição de tamanho mais homogênea (Fig. 24).

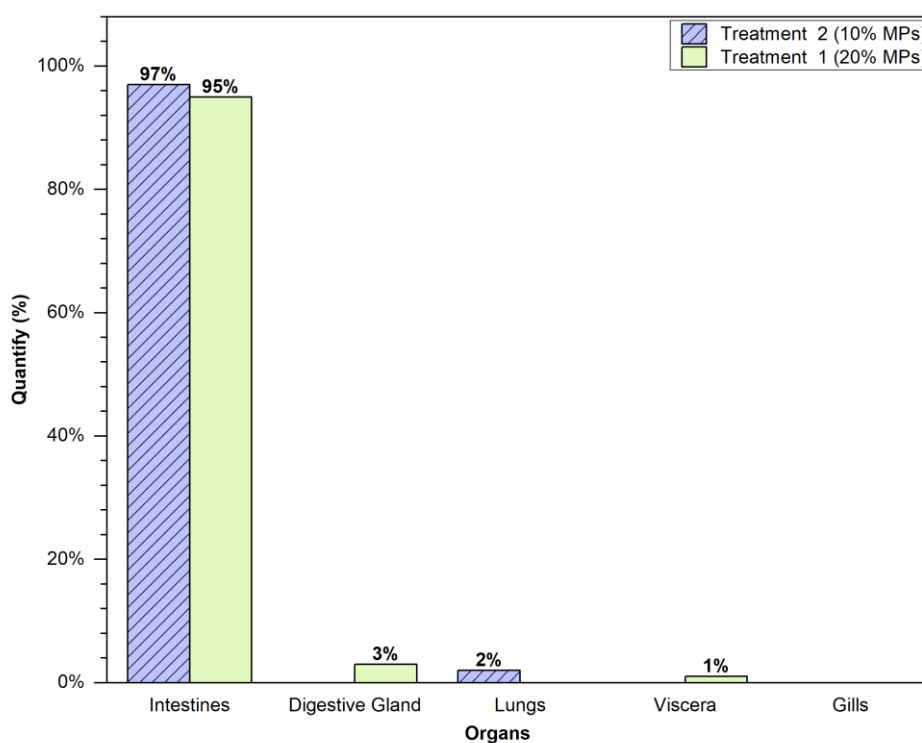


Figura 23. Total da quantidade de partículas encontradas nos órgãos dos indivíduos (n=6) dos tratamentos: Brânquias, Pulmão, Glândulas Digestivas, Intestino e Vísceras.

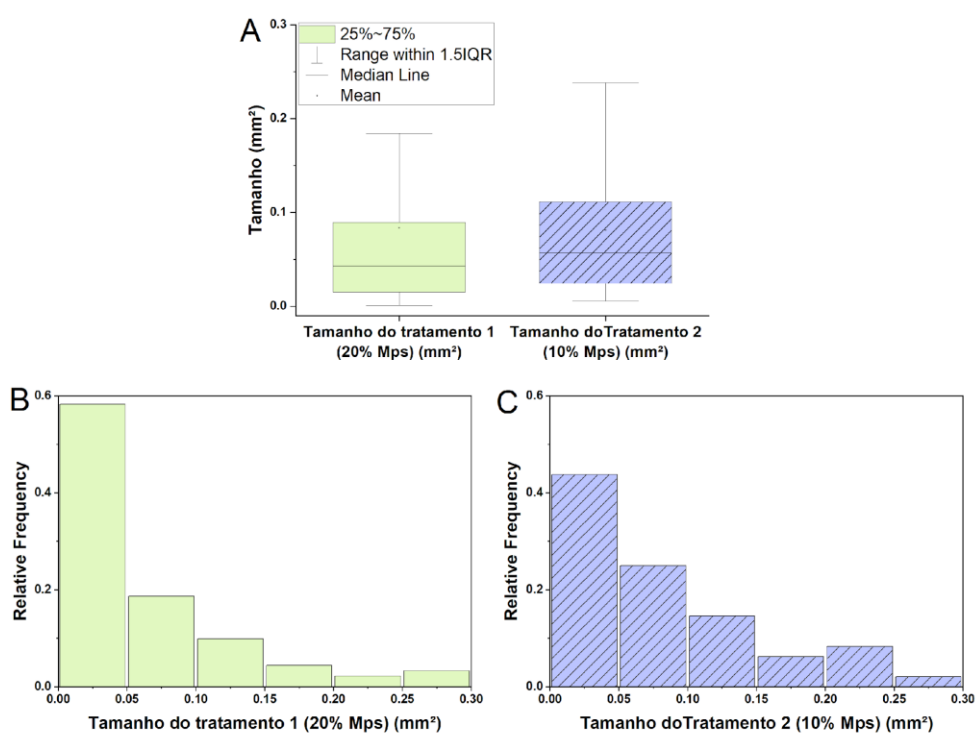


Figura 24. Quantidade e distribuição de tamanho das partículas encontradas nos intestinos dos indivíduos em ambos os tratamentos. A. Boxplot dos totais de tamanhos encontrados nos tratamentos. B. Histograma dos tamanhos encontrados no tratamento 1 (20% MPs). C. Histograma dos tamanhos encontrados no tratamento 2 (10% MPs).

Entretanto, a quantidade elevada de particulados e a aparência não foram o esperado, demonstrando que os microplásticos sofreram alterações, porém não houve indício de fragmentação e degradação em sua superfície. Os MPs apresentaram materiais aderidos (Fig. 25 B-F) em sua superfície, mostrando indícios que podem ser resíduos orgânicos da composição da ração.

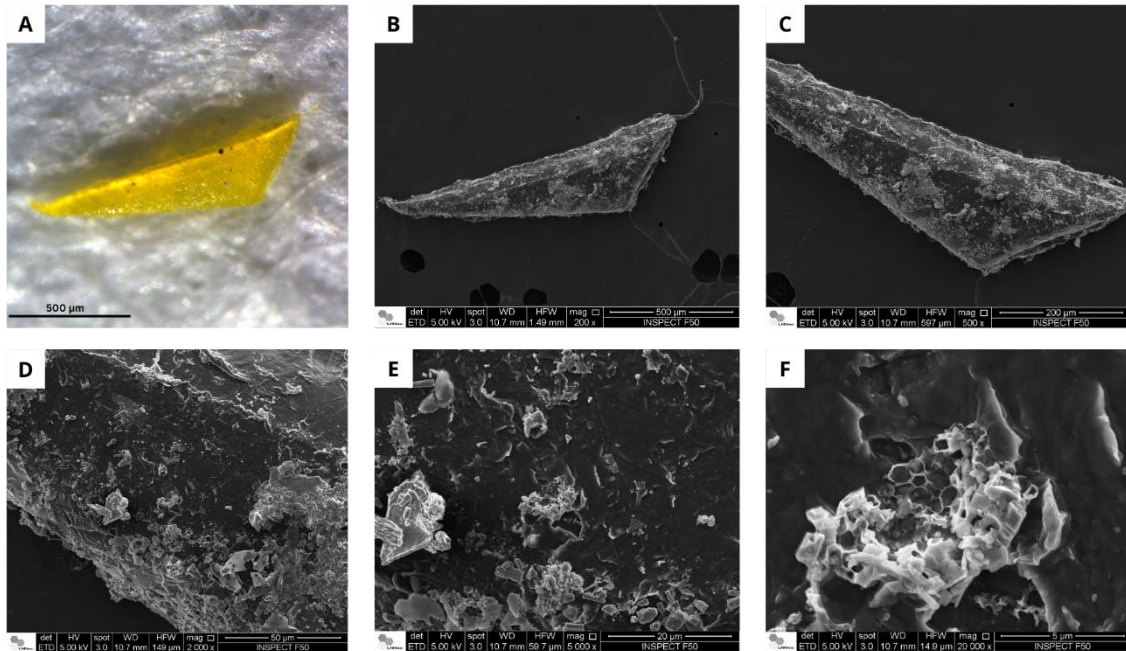


Figura 25. Imagem MEV do polietileno encontrado no intestino de um indivíduo do tratamento 1. A. Imagem adquirida pelo estereomicroscópio, aumento 80x. B. Aumento de 200, C. Aumento de 500, D. Aumento de 5.000, F. Aumento de 20.000.

A glândula digestiva é o órgão onde ocorre absorção de nutrientes, bioacumulação e desintoxicação e que, portanto, tem uma grande importância para a capacidade de adsorção de contaminantes, verificada em estudos na espécie *Pomacea canaliculata* (Kruatrachue et al., 2011; Vega et al., 2012; Arrighetti et al., 2018; Campoy-Diaz et al., 2018, 2020; Yap et al., 2023; Khamboonruang et al., 2024). No presente estudo, foram encontrados 3% de particulados somente no tratamento 1 (Fig. 23), os quais apresentaram em sua superfície material aderido semelhante aos encontrados no intestino. Tais materiais apresentam rugosidade e microestruturas esféricas em sua área que medem em torno de 416,7 nanômetros (Fig. 26 F), diferentemente do controle (Fig. 25 A-B). Por haver a presença de enzimas digestivas no processo digestivo, pode ter desencadeado reações que interagem ou corroem a superfície dos polímeros (Campoy Díaz et al. 2020).

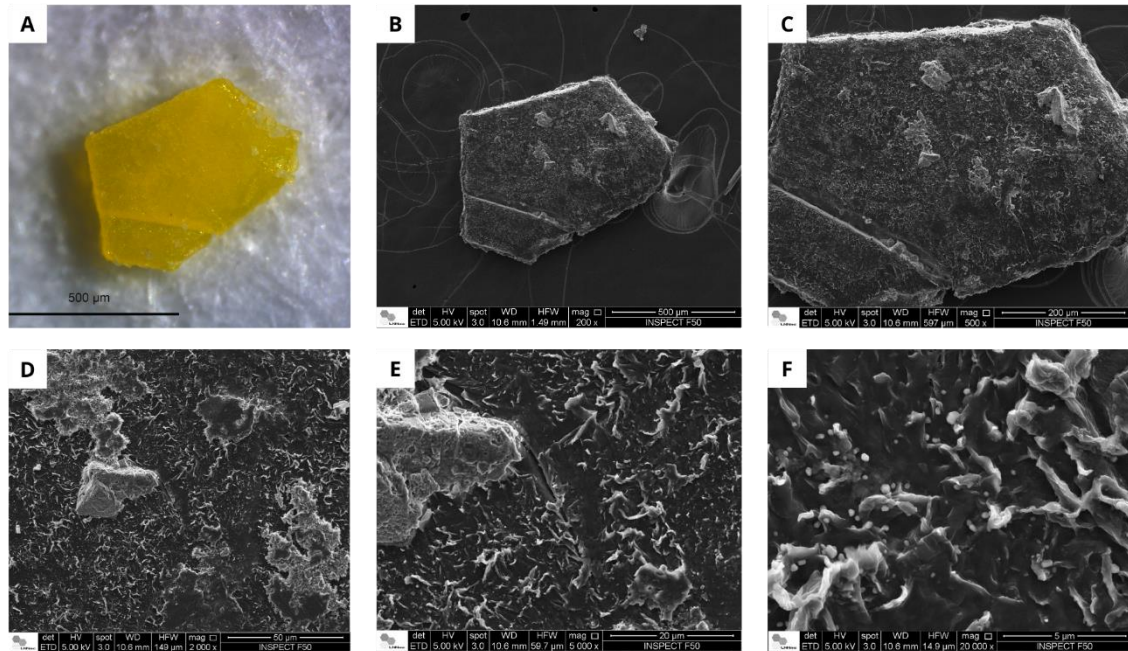


Figura 26. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polietileno encontrado na glândula digestiva de um indivíduo do tratamento 1. A. Imagem adquirida pelo estereomicroscópio, aumento 80x. B. Aumento de 200, C. Aumento de 500, D. Aumento de 2.000x, E. Aumento de 5.000, F. Aumento de 20.000.

5.5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a eliminação de microplásticos por *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) variou conforme a concentração e o tamanho das partículas. Ambos os tratamentos apresentaram uma redução inicial acentuada na quantidade durante o processo de depuração. Contudo, diferenças relevantes foram observadas ao longo do tempo entre eles: no Tratamento 1 (20% de microplásticos), verificaram-se oscilações expressivas na quantidade de microplásticos nos períodos finais, enquanto no Tratamento 2 (10% de microplásticos), as taxas de eliminação aumentaram com variações temporais, sugerindo influência de fatores fisiológicos específicas dos indivíduos. Observou-se que partículas menores foram eliminadas nos primeiros dias de depuração, ao passo que fragmentos maiores permaneceram retidos por mais tempo no trato digestório, indicando bioacumulação relacionada ao tamanho. A análise dos microplásticos presentes nos órgãos revelou maior acúmulo no intestino em comparação aos outros órgãos avaliados, sem diferença significativa de tamanho entre os particulados encontrados e os ofertados. Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível identificar potenciais impactos da digestão na superfície dos microplásticos de polietileno. Estes resultados reforçam o potencial de *P.figulina* como organismo modelo em

estudos ecotoxicológicos em ambientes de água doce, especialmente para avaliação da dinâmica de ingestão, retenção e eliminação de microplásticos.

5.6 REFERÊNCIAS

CAMPOY-DIAZ, Alejandra D. *et al.* Bioindication of mercury, arsenic and uranium in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Bioconcentration and depuration in tissues and symbiotic corpuscles. **Chemosphere**, v. 196, p. 196–205, abr. 2018.

CAMPOY-DIAZ, Alejandra D. *et al.* A freshwater symbiosis as sensitive bioindicator of cadmium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 3, p. 2580–2587, jan. 2020.

COWGER, Win; STEINMETZ, Zacharias; GRAY, Andrew; MUNNO, Keenan; LYNCH, Jennifer; HAPICH, Hannah; PRIMPKE, Sebastian; FROND, Hannah de; ROCHMAN, Chelsea; HERODOTOU, Orestis. Microplastic Spectral Classification Needs an Open Source Community: open specy to the rescue!. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 93, n. 21, p. 7543-7548, 19 maio 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00123>.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 7 jul. 2017.

HAYES, Kenneth A. *et al.* Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 58, n. 1–2, p. 245–302, abr. 2015.

KHAMBOONRUANG, Pattawan *et al.* Microplastic accumulation in the golden apple snail *Pomacea canaliculata* serves as a bioindicator in the urban lowlands of Nakhon Pathom Province, central Thailand. **Ecologica Montenegrina**, v. 80, p. 46–61, 30 nov. 2024.

KINJO, Azusa *et al.* Size-dependent elimination of ingested microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110512, dez. 2019.

KOCH, E.; VEJA, IA.; ALBRECHT E.A.; ORTEGA H.H.; CASTRO-VAZQUEZ, A. (2006). A light and electron microscopic study of pigmented corpuscles in the midgut gland and feces of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). **The Veliger**, v.48, n.1, p 18- 25, jun. 2006.

KRUATRACHUE, M. *et al.* Histopathological Effects of Contaminated Sediments on Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 6, p. 610–614, jun. 2011.

LI, Yubo *et al.* Microplastics in surface water and sediments of Chongming Island in the Yangtze Estuary, China. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, p. 15, dez. 2020.

RAHMAN, Mahfuzur *et al.* Quantification and characterization of microplastics in an intertidal gastropod the common periwinkle *Littorina littorea*. **Water Biology and Security**, p. 100401, mar. 2025.

ROCHMAN, Chelsea M. *et al.* Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703–711, 1 abr. 2019.

RODRIGUES, Cândido Carvalho; SALLA, Raquel Fernanda; ROCHA, Thiago Lopes. Bioaccumulation and ecotoxicological impact of micro(nano)plastics in aquatic and land snails: Historical review, current research and emerging trends. **Journal of Hazardous Materials**, v. 444, p. 130382, fev. 2023.

SONG, Yang *et al.* Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 447–455, jul. 2019.

TALLARICO, Lenita De Freitas. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America *. **American Malacological Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 330–336, jan. 2016.

TALLARICO, Lenita de Freitas; MIYASATO, Patrícia Aoki; NAKANO, Eliana. Rearing and Maintenance of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818): Adults and Embryos under Laboratory Conditions. 2016.

TAMBURI, Nicolás E.; MARTÍN, Pablo R. Feeding Rates and Food Conversion Efficiencies in the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, v. 51, n. 2, p. 221–232, ago. 2009.

TAMBURI, Nicolás E. Tamburi; MARTÍN, Pablo R. Effect of Food Availability on Morphometric and Somatic Indices of the Apple Snail *Pomacea canaliculata*(Caenogastropoda, Ampullariidae). **Malacologia**, v. 55, n. 1, p. 33-41, set. 2012. Institute of Malacology. <http://dx.doi.org/10.4002/040.055.0103>.

VEGA, Israel A. *et al.* Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3307–3316, set. 2012.

VENDRAMINI, Bianca Medeiros; ARRUDA, Eliane Pintor. Freshwater mollusk species of Itupararanga Reservoir, São Paulo, Brazil. 2022.

YAP, Chee Kong *et al.* Heavy Metal Exposures on Freshwater Snail *Pomacea insularum*: Understanding Its Biomonitoring Potentials. **Applied Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1042, 12 jan. 2023.

6. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados apresentados nos três artigos, amplia-se a compreensão sobre o desenvolvimento da espécie *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827) e sua aplicação em estudos ecotoxicológicos e no monitoramento ambiental.

No primeiro artigo, foi elaborado um protocolo para manter essa espécie em laboratório desde a eclosão dos ovos até o início da fase juvenil. Além disso, diferentes dietas foram testadas, identificando-se a mais eficiente para a criação dos organismos em ambiente controlado. Observou-se também a relação entre a biomassa e a alimentação durante o crescimento até a fase juvenil.

O segundo artigo abordou a abundância e a morfologia de microplásticos potencialmente excretados por *P. figulina*, ressaltando a importância dessa espécie pouco estudada na região Sudeste como bioindicadora da poluição por microplásticos em ambientes de água doce brasileiros. O trabalho analisou o processo de depuração dos indivíduos, os tamanhos predominantes dos microplásticos eliminados e, por meio da caracterização química, identificou-se os tipos de plástico disponíveis no rio Pirajibu-Mirim. Verificou-se ainda que o tempo de retenção e o formato das partículas influenciam sua eliminação pelo organismo.

No terceiro artigo, avaliou-se a passagem do polietileno pelo trato digestivo de *P. figulina* em dois tratamentos de concentração (20% e 10% de microplásticos). Ambos os tratamentos apresentaram comportamento semelhante nos primeiros dias, com eliminação abrupta do material, diferenciando-se apenas ao final do experimento. Não houve evidências de fragmentação dos microplásticos em nenhum tratamento, pois o tamanho das partículas eliminadas permaneceu igual ao ingerido. Entretanto, mesmo sem fragmentação, microplásticos foram detectados, principalmente no intestino, indicando retenção temporária durante o processo digestivo, sobretudo no tratamento de maior concentração. Análises em microscopia eletrônica revelaram que os plásticos passaram por alterações mecânicas e/ou químicas, podendo liberar aditivos do polímero. É importante destacar que o microplástico utilizado era pristino, sem sinais de degradação, apresentando maior resistência devido à presença de aditivos como plastificantes, o que resultou em maior rugosidade quando alojado na glândula. Caso os microplásticos estivessem degradados, outros efeitos poderiam ter sido observados.

Esses avanços reforçam o potencial da espécie *P. figulina* como biomonitor. Novas etapas de pesquisa são essenciais para avaliar seu uso no monitoramento ambiental, especialmente diante da poluição por plásticos em ecossistemas de água doce.

8. ANEXO – A (Artigo 1 – Versão em português)

Desenvolvimento de um protocolo nutricional para criação em laboratório de *Pomacea figulina* (Spix in Wagner, 1827)

Autores: Natalia Woppe^{1,3}, Febriana M. A. Tefa¹, Sandra L. S. Santos¹, Glaucia I. A. Sebastião², Bruna N. S. Martins¹, Mussa Issufo^{1,4}, Luciano C. Basso³, Eliane P. Arruda³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), Centro de Ciência e Tecnologia (CCTS), Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Aproveitamento de Recursos Renováveis (PPGPUR), Centro de Ciência e Tecnologia (CCTS), Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

³ Centro de Ciências Humanas e Biológicas (CCHB), Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

⁴ Instituto de Desenvolvimento Rural e Biociências (ISDRB), Universidade do Rovuma, Niassa, Moçambique.

Resumo

Contexto

Pomacea figulina é um gastrópode neotropical de água doce que tem emergido como um promissor biomonitor nativo devido às suas características ecológicas e sensibilidade a contaminantes ambientais. Porém, a falta de protocolos padronizados de criação laboratorial limita seu uso em bioensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental. Este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de cultura laboratorial controlada para *P. figulina*, com ênfase na sobrevivência e desempenho de crescimento, para apoiar sua futura aplicação em pesquisas ecotoxicológicas.

Resultados

As desovas foram coletadas em Sorocaba, São Paulo, Brasil, e incubadas sob condições controladas por 15 dias. Após a eclosão, 120 indivíduos foram distribuídos aleatoriamente em 40 aquários e mantidos por 10 semanas em temperatura e aeração constantes. Quatro tratamentos foram testados: (1) ração comercial para peixes, (2) couve fresca, (3) uma mistura de ração para peixes e couve e (4) dieta produzida em laboratório composta por ração para peixes, cascas de ovos, ágar e água. Os indivíduos alimentados com a dieta produzida em laboratório apresentaram o melhor desempenho biológico, caracterizado pela menor taxa de mortalidade e pelos maiores ganhos médios de massa corporal e comprimento da casca. A dieta mista e a dieta apenas com couve apresentaram padrões de desenvolvimento intermediários e semelhantes, com crescimento gradual e sobrevivência relativamente estável. A dieta baseada apenas em peixes resultou em um crescimento modesto, mas contínuo, e em uma taxa de mortalidade intermediária. No geral, a dieta foi identificada como um fator-chave que influencia o crescimento e a sobrevivência, embora a qualidade da água e as características das ninhadas de ovos também possam ter contribuído para a variação observada entre os tratamentos.

Conclusões

A composição nutricional desempenha papel decisivo no sucesso da criação laboratorial de *P.figulina*. O uso de uma dieta laboratorial suplementada com cálcio fornece uma base confiável para a manutenção desta espécie sob condições controladas. Esses achados reforçam a adequação de *P.figulina* como organismo modelo para bioensaios ecotoxicológicos e biomonitoramento ambiental, contribuindo para o desenvolvimento de metodologias padronizadas para moluscos de água doce neotropicais.

Palavras-chave: Desempenho de crescimento, técnicas de manejo, protocolo alimentar, caramujos de água doce, Ampullariidae, Mollusca.

Introdução

Pomacea figulina (Spix in Wagner, 1827) é uma espécie de gastrópode de água doce pertencente à família Ampullariidae. A espécie ocorre no Brasil com distribuição costeira, do Nordeste ao Sudeste do país (Silvana C. Thiengo, comunicação pessoal), e foi relatada pela primeira vez na Bacia do Rio Sorocaba, no estado de São Paulo, por Rodrigues et al. (2016). Embora outras espécies do mesmo gênero, como *Pomacea canaliculata* e *Pomacea scalaris*, sejam reconhecidas como invasoras (Wu et al., 2011; Hayes et al., 2015), *P. figulina* não foi, até o momento, relatada fora de sua área de distribuição nativa. A reprodução em seus habitats ocorre entre setembro e março, e a oviposição ocorre acima do nível da água. Os ovos apresentam coloração rosada, tornando-se acinzentados à medida que a eclosão se aproxima, após aproximadamente 15 dias (Thiengo et al., 2011). Alimentam-se principalmente de vegetação aquática, mas são considerados generalistas, pois apresentam hábitos necrófagos e também consomem organismos vivos presentes nos bentos (Thiengo et al., 2011).

Os ambientes aquáticos podem ser contaminados por poluentes de diversas fontes, sejam provenientes de atividades agrícolas ou minerárias, bem como de fontes domésticas ou industriais. Os organismos que habitam estes ambientes estão expostos a xenobióticos, como inseticidas e pesticidas, que são substâncias estranhas aos seus corpos. Porém, em alguns casos, a exposição a xenobióticos pode induzir alterações nesses organismos, como observado em fêmeas de Caenogastropoda, que podem apresentar alterações no sistema reprodutivo devido a um fenômeno chamado *imporx*, desencadeado pela presença de desreguladores endócrinos no ambiente (Fernandez, 2011; Huaquín, Lorena & Osorio, 2011).

A qualidade de um ambiente aquático pode, assim, ser inferida pela observação das respostas dos seus organismos vivos (Moura e Silva, Queiroz & Trivinho-Strixino, 2008). A ecotoxicologia é uma área da ciência que permite a compreensão da interação entre substâncias e organismos através de bioensaios ecotoxicológicos (Magalhães & Filho, 2008). Esses testes

utilizam organismos bioindicadores, que devem preferencialmente ser de fácil manuseio em laboratório, além de abundantes e sensíveis (Magalhães & Filho, 2008; Moura e Silva, Queiroz & Trivinho-Strixino, 2008).

Os bioensaios ecotoxicológicos devem ser padronizados para garantir a reprodutibilidade da metodologia, produzindo resultados confiáveis. Embora não haja informações específicas para *Pomacea figulina*, sabe-se que espécies deste gênero apresentam ciclo de vida curto (um a quatro anos), rápido crescimento (Hayes et al., 2015) e ocorrem em altas densidades na Bacia do Rio Sorocaba, no estado de São Paulo, Brasil (Rodrigues et al., 2016), o que indica seu uso como bioindicadores ambientais. Outros aspectos que podem ser considerados em relação à *Pomacea* como um bom bioindicador biológico são o seu sedentarismo (baixa mobilidade) (Seuffert; Martín, 2012), que garante que os impactos detectados refletem as condições de um local específico, e a sua capacidade de bioacumulação (Campoy-Diaz et al., 2018, 2020; Vega et al., 2012; Yap et al., 2023), que permite a detecção de contaminantes conhecidos e emergentes, como microplásticos (Khamboonruang et al., 2024, Yao et al, 2025), em seus tecidos, mesmo em baixas concentrações na água. Além disso, é um organismo abundante na região, o que facilita a amostragem; possui ciclo de vida e taxonomia conhecidos, permitindo comparações precisas em laboratório; e apresenta sensibilidade previsível aos estressores ambientais, funcionando como um “sensor vivo” capaz de sinalizar mudanças ecológicas ou químicas de forma clara e mensurável. Seu hábito bentônico o torna altamente adequado para testes de toxicidade de sedimentos de água doce (Gonçalves et al., 2014). Testes de toxicidade para herbicidas e metais traço já foram realizados com espécies do gênero *Pomacea*, como *Pomacea lineata* e *Pomacea canaliculata* (Melo et al. 2000; 2014; Dumme et al 2012), que demonstraram que essas espécies são sensíveis a herbicidas e acumulam metais pesados, principalmente no trato digestivo e na glândula digestiva. No entanto, não existem protocolos de melhoramento para estes organismos que lhes permitam tornar-se modelos padrão em tais testes, o que seria apropriado para a sua utilização como bioindicadores, a fim de produzir resultados comparáveis e garantir o bem-estar animal. Muitas variáveis podem influenciar o crescimento e a sobrevivência de espécies do gênero *Pomacea*, como dieta, temperatura e densidade (Lima et al, 2006; Seuffert & Martin, 2013; Garr et al, 2011).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo nutricional padronizado para a criação de *Pomacea figulina* em condições de laboratório, fornecendo uma estrutura controlada que possa garantir reprodutibilidade e confiabilidade em bioensaios

ecotoxicológicos. Ao identificar condições ótimas para dieta, sobrevivência e crescimento, este trabalho busca facilitar o uso de *P. figulina* como espécie modelo bioindicadora. A padronização da manutenção laboratorial não só permite resultados comparáveis entre estudos, mas também contribui para o bem-estar animal e aumenta a capacidade de detectar e monitorar contaminantes ambientais em ecossistemas de água doce. Em última análise, esta abordagem apoia tanto o avanço da investigação ecotoxicológica como a aplicação mais ampla de *P. figulina* em programas de monitorização ambiental.

Metodologia

Amostragem de Campo e Manutenção Pré-Experimental de Organismos

As desovas de *Pomacea figulina* foram coletadas no rio Pirajibu-Mirim, no município de Sorocaba (23°29'24,2"S; 47°23'06,3"W), durante o período reprodutivo da espécie (fevereiro de 2025). A coleta foi realizada manualmente nas margens dos rios. Utilizando luvas e deslizando cuidadosamente pela vegetação, as massas de ovos foram removidas para evitar quebras. No total, 16 massas de ovos foram coletadas e transportadas ao laboratório em caixa de isopor, mantida em ambiente seco e sem contato com água.

No laboratório, as desovas foram divididas em 4 bandejas com 500 mL de água desclorada (água desclorada com bolhas) e transferidas para uma incubadora tipo BOD, sob fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro e temperatura constante de 24 °C ± 1 °C. A cada 2 dias, a eclosão foi verificada; os animais nascidos foram empurrados para dentro da água com o auxílio de uma escova, e o volume de água foi reabastecido conforme necessário. Após 20 dias na incubadora, os caramujos eclodidos foram transferidos para bandejas contendo água desclorada (água desclorada com bolhas), temperatura de 24 °C ± 1 °C controlada por termostato (Aqua Pet), fluxo de ar com filtro biológico, e mantidos por 22 dias em fase de adaptação. Nesse período, a água foi trocada a cada 4 dias, invertendo a bandeja, utilizando peneira (0,005 mm²) para evitar perda de caramujos. A cada troca de água foi oferecido 1 g de ração triturada para peixes ornamentais (Pond Koi Vibrance Tetra™) até o início da fase experimental. Essa ração comercial foi escolhida por apresentar alto teor de proteína (31%). Estudos anteriores indicam que dietas ricas em proteínas são adequadas para gastrópodes (Islam et al. 2021). Portanto, optamos por equalizar as oportunidades de sobrevivência dada a elevada taxa de mortalidade logo após o nascimento. Esperamos cerca de 15 dias para selecionar os que sobreviveram.

Desenvolvimento e preparação de dietas experimentais

Foram desenvolvidas quatro dietas experimentais distintas: A primeira dieta (TR1) consistia exclusivamente de ração comercial triturada para peixes ornamentais (Pond Koi Vibrance Tetra™). Para seu preparo, os grânulos da ração foram triturados mecanicamente em liquidificador e peneirados em malha de 1,00 mm para padronização do tamanho das partículas, favorecendo a ingestão pelos indivíduos. As partículas resultantes foram armazenadas em recipientes de vidro. As partículas foram acondicionadas em recipientes de vidro borossilicato de 100 ml e armazenadas em local abrigado para protegê-las da luz e da umidade. Essa ração comercial foi escolhida por apresentar alto teor de proteína (31%).

A segunda dieta (TR2) foi preparada com folhas trituradas de couve orgânica (*Brassica oleracea*). O preparo envolveu a lavagem das folhas em água corrente e posterior secagem em forno de convecção (Mondial - 1500 W) a 180 °C por 10 minutos. Posteriormente, as folhas secas foram trituradas em liquidificador (Philips Walita Liqfaz - 350 W) por 2 minutos para obtenção de um pó homogêneo. Esse pó foi então armazenado em potes de vidro em local seco até o uso.

A terceira dieta (TR3) correspondeu à combinação de ração comercial triturada com couve desidratada em pó, na proporção de massa de 1:1 (ração para peixe + *Brassica oleracea*). A homogeneização dos ingredientes foi realizada manualmente em ambiente limpo, e a mistura resultante foi armazenada em recipiente fechado em temperatura ambiente.

Por fim, a quarta dieta (TR4) foi formulada como dieta padrão de laboratório, composta por ração comercial triturada (Pond Koi Vibrance Tetra™), casca de ovo moída, ágar e água destilada. As cascas dos ovos foram previamente lavadas, secas em estufa a 60°C, moídas e peneiradas até formar um pó fino. O ágar foi preparado na concentração de 1,5% em água destilada aquecida a 95°C, atuando como aglutinante (Phillips; Willians, 2009). Todos os ingredientes foram misturados até formar uma pasta homogênea, a mistura foi moldada manualmente em esferas de 0,25 g e armazenada sob refrigeração a 4 °C. A composição nutricional dos alimentos pode ser consultada no material complementar Tabela S1.

Configuração e execução experimental

Após a fase de adaptação, os indivíduos de *Pomacea figulina* foram distribuídos aleatoriamente para início dos testes experimentais, organizados em quatro tratamentos alimentares distintos, correspondentes às dietas descritas anteriormente. Cada tratamento foi

composto por 10 aquários, totalizando 40 unidades experimentais. Os aquários foram preenchidos com 1,2 litros de água sem cloro e mantidos em condições ambientais controladas de oxigenação e temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, equipados com sistema de aeração de pedras de ar e filtro biológico. Para o controle de oxigênio, foi utilizada em cada réplica uma bomba com potência de 3W (1000 A), vazão de 4,2 L/min e pressão de 0,014 MPa, comumente utilizada em aquários, garantindo a oxigenação da água. A aeração de menor intensidade foi selecionada para minimizar potenciais estressores associados à aeração de maior intensidade, reduzindo assim possíveis impactos nos dados coletados.

O filtro foi feito de tubo de PVC e preenchido com carvão ativado, calcário e estopa, visando ajudar a manter os níveis de amônia. O pH varia de 8 a 8,5, medido por phmetro digital portátil k39 Kasvi, a cada 4 dias. Foram alocados três indivíduos em cada aquário, totalizando 120 exemplares no início do experimento, sendo 30 indivíduos por tratamento.

Os sistemas experimentais foram mantidos a cada quatro dias. Essa manutenção incluiu limpeza dos aquários, retirada de restos de comida, troca completa da água e oferta de dieta padronizada (0,25 g por garrafa). Este regime foi seguido para garantir a qualidade físico-química do ambiente e evitar o acúmulo de resíduos nitrogenados, como a amônia.

Avaliações morfométricas, pesagens de indivíduos e verificações de mortalidade foram realizadas semanalmente durante as 10 semanas de duração do experimento.

Análise Morfométrica e de Mortalidade

Para realizar as medidas de comprimento foi utilizada uma câmera de captura de imagens Leica (modelo MC 170 HD), acoplada a um estereomicroscópio (Leica S8AP0) e software de medição (LAS v4.11). A partir da semana 4 a medição foi realizada com paquímetro digital Zaas IP54, devido às limitações da câmera em captar o tamanho dos animais. O comprimento foi obtido do ápice da casca até sua extremidade oposta, conforme Figura 1. O peso dos animais foi obtido em balança analítica AUY220 (precisão de $\pm 0,0001\text{g}$). As fases do processo experimental estão resumidas na Figura 2.

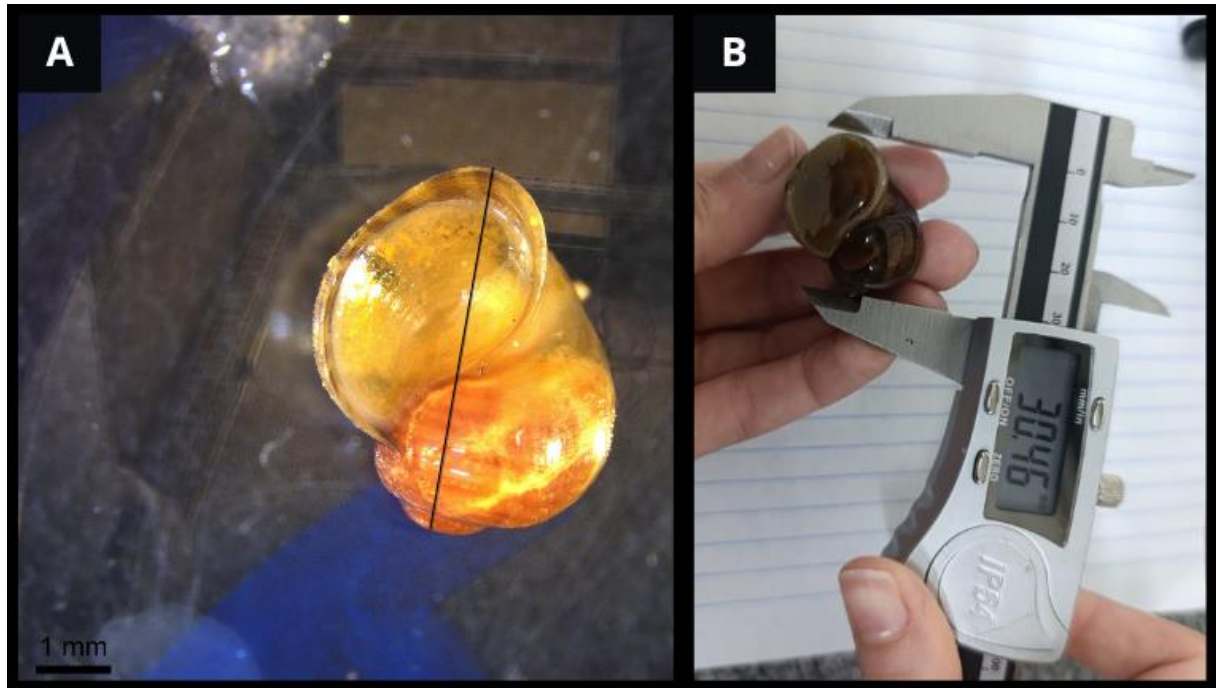


Fig.1 Representação dos métodos de medição do comprimento da concha para indivíduos de *Pomacea fugulina*. (A) Vista aproximada do invólucro translúcido posicionado sob um estereomicroscópio usando o software LAS v4.11. Uma linha de referência preta indica o eixo ao longo do qual o comprimento do casco é medido; uma barra de escala de 1 mm aparece no canto inferior esquerdo; (B) Medição manual da concha de um gastrópode adulto utilizando um paquímetro digital. As mãos de uma pessoa seguram a concha enquanto o paquímetro exibe a medição do comprimento registrada em sua tela digital.

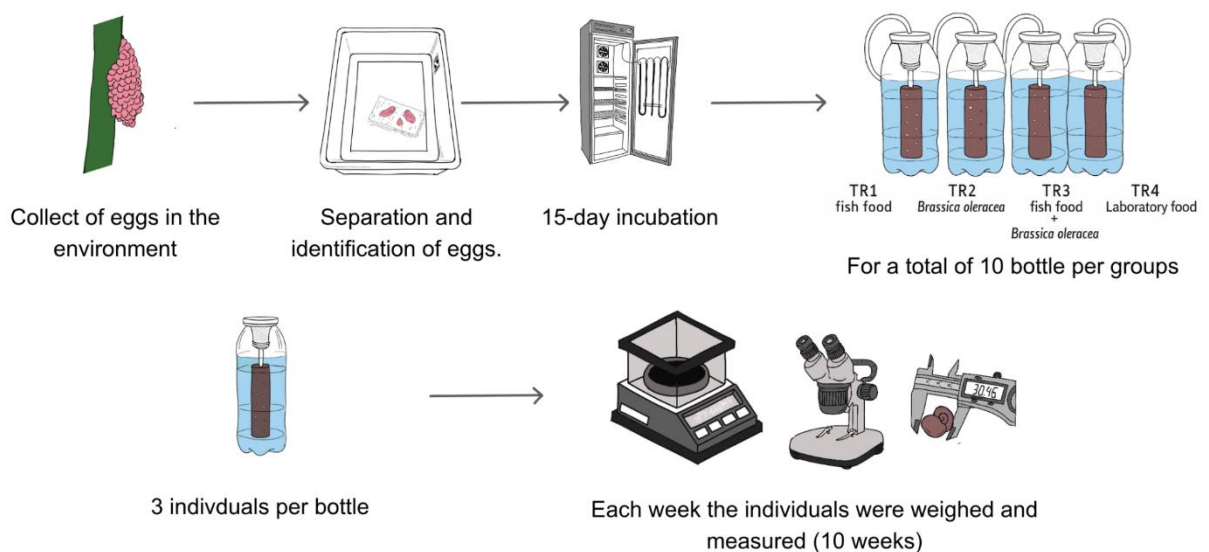


Fig. Representação esquemática da sequência metodológica. Os ovos são coletados do ambiente e posteriormente separados e identificados em laboratório. Após um período de incubação de 15 dias, os grupos são distribuídos em frascos experimentais (n=10), cada um contendo três indivíduos, totalizando 30 organismos nos diferentes tratamentos. Semanalmente, durante dez semanas, os indivíduos são

pesados em balança analítica e medidos sob um estereomicroscópio e/ou paquímetro para monitorar o crescimento.

Análise de amônia tóxica

Durante o primeiro mês de exposição, a água nos frascos foi monitorada semanalmente quanto ao teor de amônia tóxica (NH₃), uma substância produzida pela decomposição da matéria orgânica (Zhang et al., 2023) e pela excreção de resíduos nitrogenados por animais (Cruz et al., 2013). Para isso, foi utilizado um kit de medição de amônia tóxica para água doce (LabconTest). A tabela fornecida pelo fabricante foi adotada como parâmetro de qualidade da água, visto que não existem parâmetros estabelecidos para gastrópodes. Esses dados estão disponíveis na tabela S2 do material suplementar.

Cálculo da porcentagem de crescimento semanal

Para obter a taxa de crescimento semanal (TR), a massa média final (\bar{x} final) foi subtraída da massa média inicial do tratamento (\bar{x} inicial); a diferença foi dividida pelo tempo do experimento (t_{exp}) (10 semanas) (Equação 1):

$$TR = \left(\frac{\bar{x}_{final} - \bar{x}_{inicial}}{t_{exp}} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

Para obter a taxa de crescimento semanal (GGR) em porcentagem, TR foi dividida pela massa média inicial do tratamento (\bar{x} inicial) e então multiplicada por 100 (Equação 2).

$$GGR = \left(\frac{TR}{\bar{x}_{inicial}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Análises Estatísticas

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Grubbs para remoção de outliers, seguido pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Como as premissas de normalidade e homogeneidade não foram atendidas, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar os grupos independentes. Diferenças específicas entre pares de grupos foram posteriormente identificadas pelo teste post-hoc de Dunn. Um valor de p inferior a 0,005 foi definido como o limiar para significância estatística.

Resultados

Os primeiros indivíduos eclodiram na incubadora dez dias após a coleta. Entre as primeiras eclodões, houve um intervalo de dez dias até que os últimos indivíduos estivessem prontos para transferência para o aquário, iniciando assim a fase de aclimação.

O tratamento TR2 (*B. oleracea*) apresentou a maior taxa de mortalidade, atingindo 83,3% dos indivíduos, com apenas 5 indivíduos restantes ao final do experimento (Fig. 3). Isso explica a diminuição do peso e do comprimento médio dos indivíduos entre a 7ª e a 9ª semana, uma vez que os organismos menores sobreviveram após a redução (Fig. 4). Os tratamentos TR1 (ração para peixes) e TR3 (ração para peixes + *Brassica oleracea*) apresentaram taxas de mortalidade intermediárias, chegando ao final do experimento com 17 e 14 indivíduos, correspondendo a 43% e 53% de mortalidade, respectivamente. Em ambos os grupos, a maior mortalidade foi registrada nas três primeiras semanas: TR1 (53,3%) e TR3 (36,6%). No entanto, o tratamento TR4 (dieta de laboratório) apresentou a menor taxa de mortalidade (26,7%), diminuindo de 30 para 27 indivíduos na segunda semana, de 25 na sexta e de 22 a partir da sexta semana. Os resultados completos são apresentados na Tabela S7 do Material Suplementar.

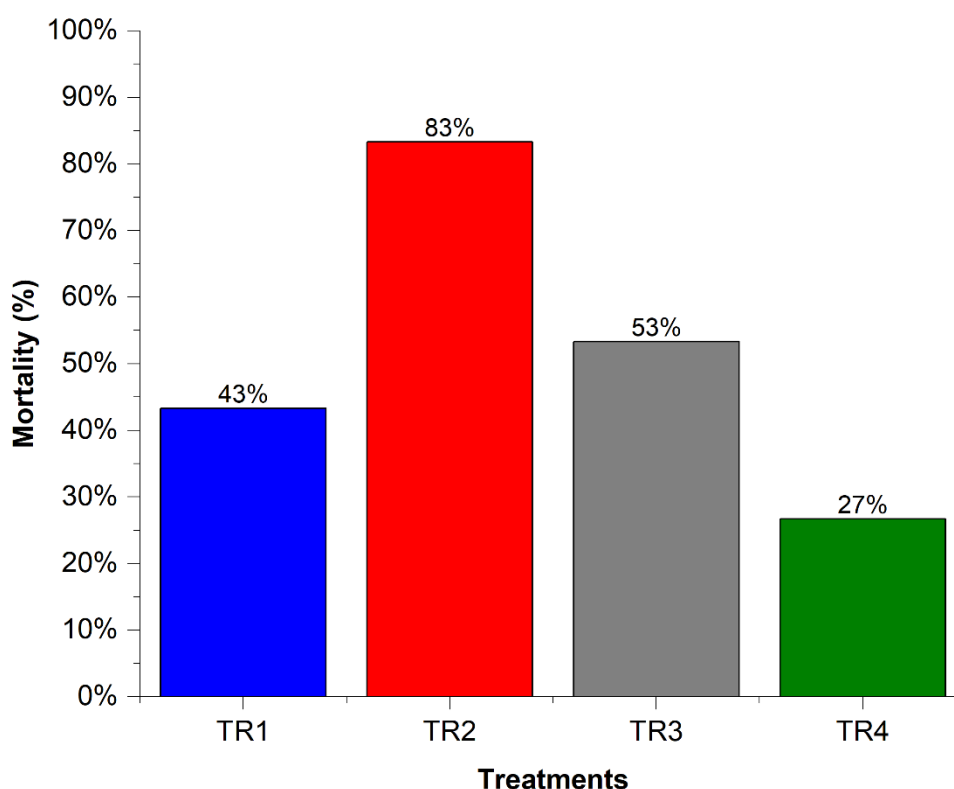


Fig. 3. Gráfico de barras mostrando a porcentagem de mortalidade de *P. figulina* ao final do experimento (10 semanas), de acordo com os tratamentos alimentares. A mortalidade por semana está registrada no material suplementar. TR1: ração para peixes (cinza); TR2: *Brassica oleracea* (vermelho); TR3: ração para peixes + *Brassica oleracea* (azul); TR4: dieta padrão de laboratório (verde).

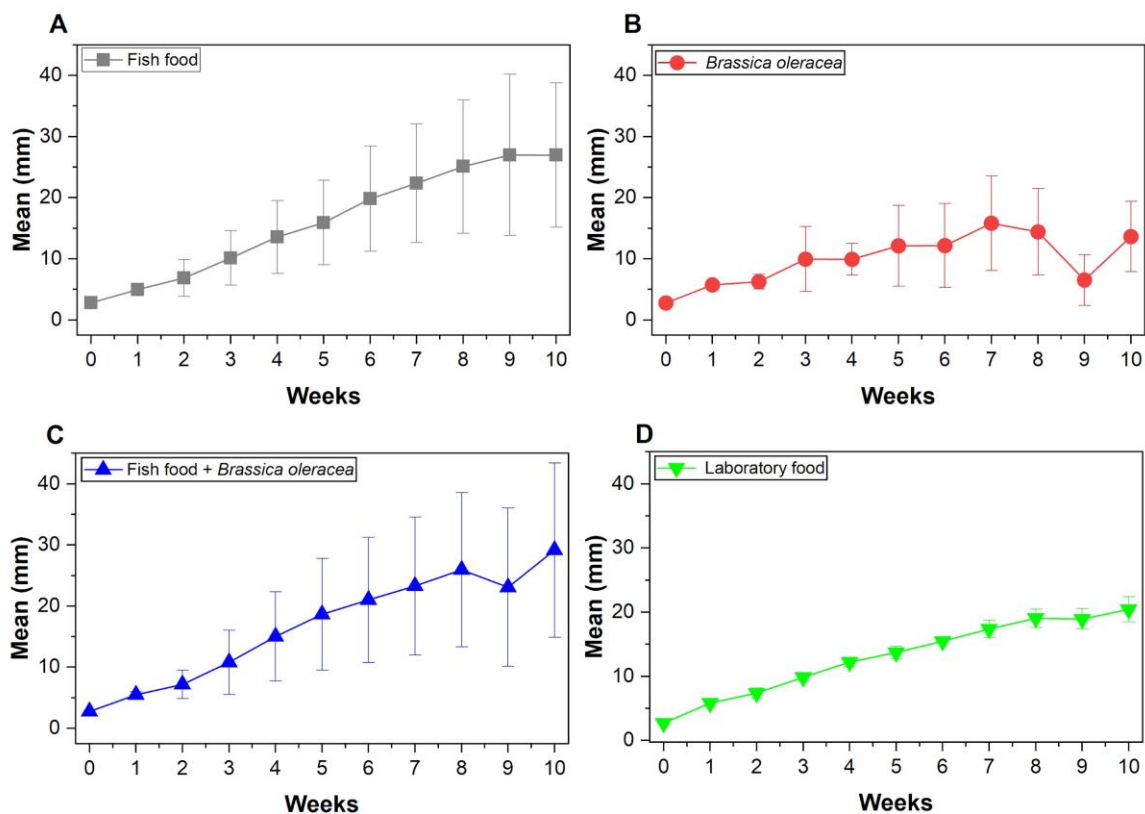


Fig. 4. Gráfico de linhas mostrando o tamanho médio (mm) (\pm desvio padrão) de *P. figulina* ao longo de 10 semanas, submetida a quatro dietas diferentes. A. TR1: ração para peixes; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: ração para peixes + *Brassica oleracea*; D. TR4: dieta padrão de laboratório.

A biomassa de *P. figulina* apresentou uma tendência de crescimento após duas semanas de experimentação sob diferentes regimes de alimentação (Fig. 5). O tratamento 3 promoveu o maior ganho de massa médio ($1,90 \pm 2,19$ g) ao longo das 10 semanas, seguido pelo TR1 ($1,82 \pm 2,09$ g). O TR2 resultou no menor ganho de massa e em uma redução na massa média a partir da oitava semana. O TR4 apresentou crescimento estável e intermediário, com desempenho inferior ao TR1 e ao TR3 (Figura 6).

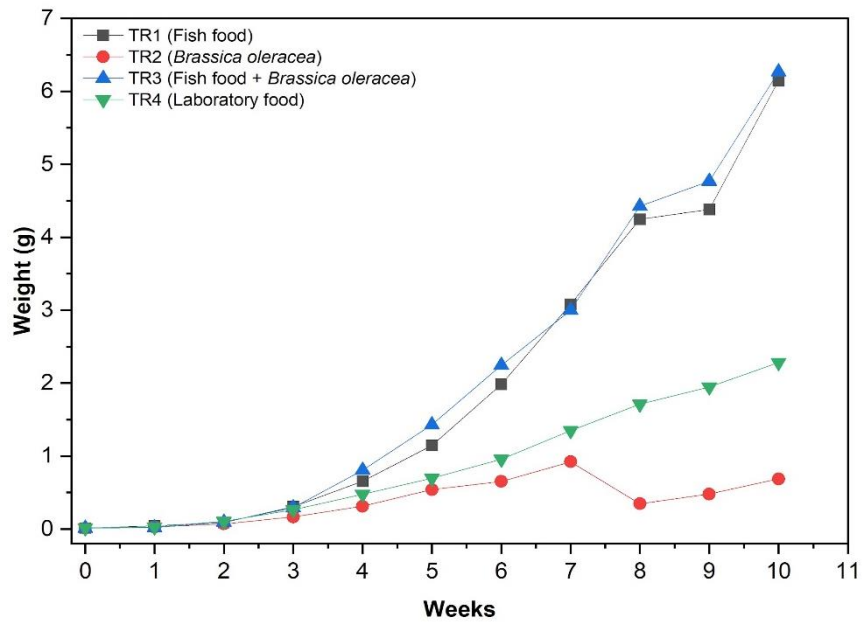


Fig. 5. Gráfico de linhas mostrando o peso médio (g) de *P. figulina* ao longo de 10 semanas, sob diferentes regimes alimentares. TR1: ração para peixes (cinza); TR2: *Brassica oleracea* (vermelho); TR3: ração para peixes + *Brassica oleracea* (azul); TR4: dieta padrão de laboratório (verde).

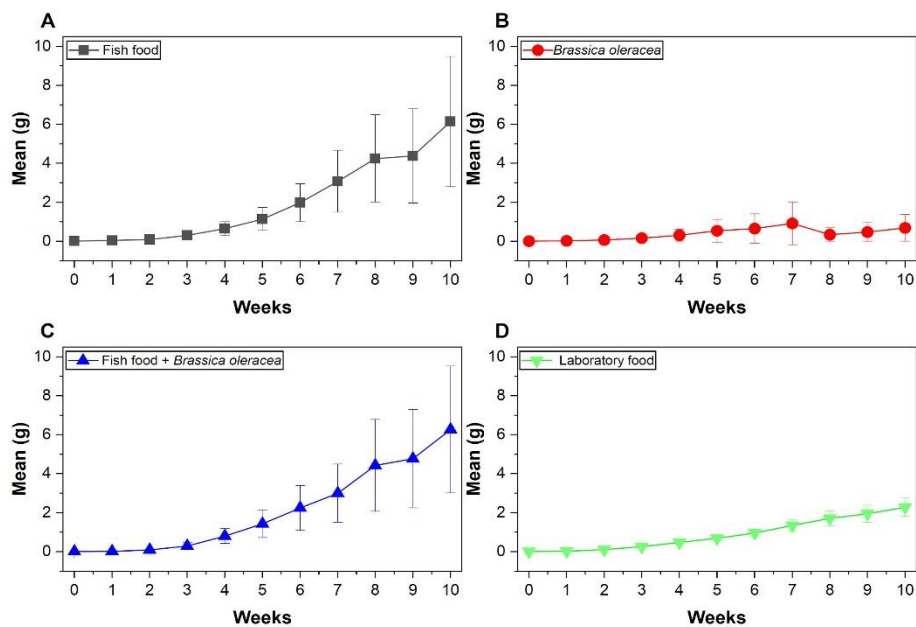


Fig. 6. Gráfico de linhas mostrando o peso médio (g) (\pm desvio padrão) de *P. figulina* ao longo de 10 semanas, submetida a quatro dietas diferentes. A. TR1: ração para peixes; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: ração para peixes + *Brassica oleracea*; D. TR4: dieta padrão de laboratório.

Na comparação estatística entre os tratamentos em relação à massa mediana (g), utilizando o teste ANOVA de Kruskal-Wallis ($p < 0,005$), o TR3 apresentou a maior massa corporal mediana (0,94 g), seguido pelo TR1 (0,93 g) e TR4 (0,65 g). Esses três tratamentos apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,001$) em comparação com a mediana do TR2 (0,12 g). Não houve diferença estatisticamente significativa entre TR1, TR3 e TR4. Os resultados estatísticos estão disponíveis na Tabela S3 e na Figura S1 do material suplementar.

O comprimento dos indivíduos apresentou um padrão semelhante ao observado para a massa corporal (Fig. 7). Após 10 semanas de experimento, o tratamento TR3 registrou o maior crescimento médio ($15,30 \pm 9,06$ mm), seguido pelos tratamentos TR1 ($14,77 \pm 8,75$ mm) e TR4 ($13,00 \pm 5,78$ mm) (Fig. 4). Em contraste, o TR2 apresentou o menor aumento médio, atingindo $8,44 \pm 4,37$ mm ao final do período experimental (Tabela S4 do Material Suplementar). Além disso, a estimativa do crescimento médio semanal indicou um desempenho superior no TR3 (2,64 mm/semana), seguido pelo TR1 (2,41 mm/semana) e TR4 (1,77 mm/semana), enquanto o TR2 novamente apresentou o menor valor (1,09 mm/semana) (os resultados podem ser vistos na Tabela S5 do material suplementar).

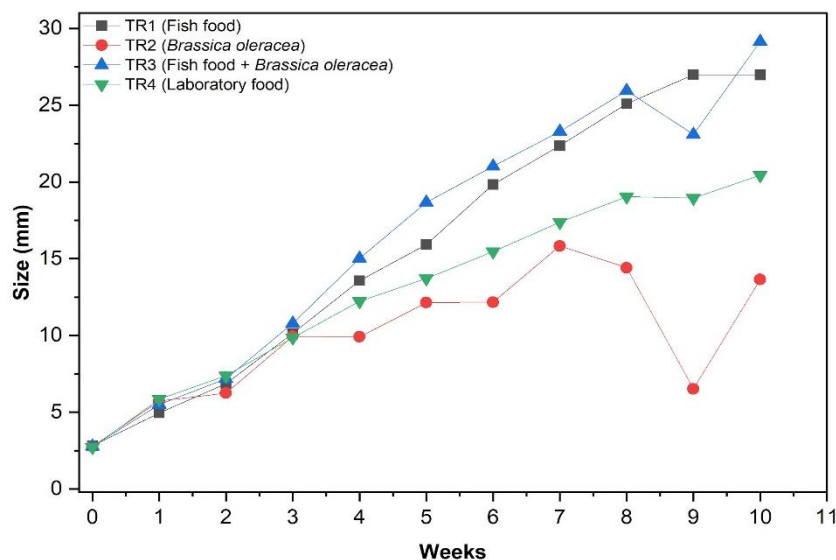


Fig. 7. Gráfico de linhas mostrando o tamanho médio (mm) de *P. figulina* ao longo de 10 semanas, sob diferentes regimes alimentares. TR1: ração para peixes (cinza); TR2: *Brassica oleracea* (vermelho); TR3: ração para peixes + *Brassica oleracea* (azul); TR4: dieta padrão de laboratório (verde).

As análises estatísticas mostraram que apenas o tratamento TR2 diferiu significativamente dos demais, apresentando a menor mediana (7,67 mm) entre os tratamentos. Os tratamentos TR4, TR1 e TR3 apresentaram medianas de 13,44 mm, 14,39 mm e 15,18 mm, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa entre eles.

Discussão

Vendramini & Arruda (2022) identificaram a espécie *Pomacea figulina* como um possível bioindicador ambiental para a região sudeste do Brasil, especialmente para a bacia do rio Sorocaba, um dos principais afluentes do rio Tietê. Bioindicadores têm sido utilizados para estudar toxicidade ambiental e, como demonstrado por Marques et al. (2021) e Coen e Janssen (1997), uma dieta adequada é essencial para o sucesso do experimento, pois afeta o crescimento, a reprodução e a sensibilidade a substâncias tóxicas, alterando drasticamente os parâmetros do bioensaio.

Neste trabalho, exploramos como diferentes dietas podem ter desempenhos distintos na criação e sobrevivência de espécimes de *Pomacea figulina* em condições de laboratório. Estudos com espécies do mesmo gênero mostraram que dieta, densidade e temperatura podem influenciar o crescimento e a sobrevivência da espécie (Alves et al., 2006; Seuffert & Martin, 2013; e Garr et al., 2011). Embora posturas de ovos de cor rosa tenham sido cuidadosamente selecionadas (Hayes, 2015), variações no dia da oviposição ainda podem ter ocorrido, resultando em diferenças nos estágios de desenvolvimento embrionário e potencialmente influenciando o período de eclosão.

Descobrimos que uma dieta composta de ração para peixes mais couve apresentou o melhor desempenho em relação ao tamanho e peso ao longo de 10 semanas do experimento. Garr et al. (2011) realizaram um experimento semelhante com *Pomacea paludosa* e descobriram que a mistura de ração para bagre associada a *Ulva* (alga marinha) apresentou melhor desempenho, seguida pela dieta com ração apenas, em relação às dietas compostas apenas por alface romana, apenas por *Utricularia* e apenas por *Ulva*. A ração para bagre utilizada pelos autores tinha alta concentração de proteína (34,2%), indicando que a quantidade de proteína pode ser um fator determinante no resultado obtido, juntamente com lipídios (8%), fibras vegetais e vitaminas. No entanto, a falta de informações sobre a formulação da ração dificulta a replicação. A escolha da ração Pond Koi Vibrance Tetra™ é semelhante em composição, contendo 31% de proteína, 6% de lipídios, 7% de minerais e 1% de cálcio. Outro estudo de Islam et al. (2021) demonstrou que ração para peixes com concentração de proteína dietética entre 30% e 35% foi mais eficaz para o ganho de peso de caramujos-maçã (*Pila globosa*) do que dietas compostas exclusivamente de farinha de peixe (90%–99% de proteína) ou uma combinação de peixe e algas.

No presente trabalho, a ração utilizada possui 31% de proteína, valores que estão de acordo com a faixa identificada nas pesquisas supracitadas. Além disso, rações comerciais disponíveis no mercado brasileiro atendem consistentemente a essa proporção de proteína. Essa concentração de proteína foi suficiente para sustentar o crescimento animal, como evidenciado pelo desempenho observado nos tratamentos TR3 com ração para peixes + dieta com couve orgânica e TR1 com ração para peixes, que

foram os mais eficazes. A dieta TR3 combinou proteína com outras substâncias interessantes presentes na couve, como cálcio, selênio, potássio, magnésio, fósforo, ferro, manganês e cobre (Thavarajah et al., 2019), além de diferentes concentrações de vitaminas A, K e C (Farnham et al., 2012), que são importantes para a integridade dos tecidos, o metabolismo do cálcio e a imunidade, e podem ter atuado sinergicamente para beneficiar o condicionamento fisiológico e a sobrevivência dos indivíduos (Mladěnka et al., 2021, Brancaccio et al., 2022). A água utilizada no laboratório apresentava baixos níveis de cálcio, portanto, se não houvesse cálcio suficiente na ração, isso afetaria a mortalidade, como observado na dieta TR1. Na dieta TR3, o cálcio foi adicionado à ração. Consequentemente, a ração utilizada no laboratório apresentou baixa taxa de mortalidade. Por outro lado, as dietas com menor teor de proteína apresentaram o pior desempenho em quase todos os parâmetros observados. Contudo, a dieta padrão de laboratório (TR4) diferiu dos demais tratamentos em termos de mortalidade, apresentando a maior taxa de sobrevivência entre os tratamentos e sendo o único parâmetro a apresentar diferença estatisticamente significativa. Em relação ao tratamento TR2, uma dieta composta exclusivamente de couve orgânica, a baixa eficácia deste tratamento é consistente com os padrões observados nas Figuras 4 e 6, onde há uma queda acentuada na massa e no comprimento médios a partir da oitava semana, quando o número de indivíduos neste tratamento diminuiu de 27 na terceira semana para 23 na quarta e 9 na sexta, representando uma queda de 60% em três semanas.

Vale destacar que a quantidade de alimento oferecida por garrafa permaneceu a mesma do início ao fim do experimento. Assim, em aquários com menos indivíduos, a oferta de alimento excedeu a demanda, o que resultou em maior decomposição da matéria orgânica e possivelmente maior liberação de amônia (Jones et al. 1982). Portanto, recomendamos que estudos futuros ajustem as quantidades de ração periodicamente, de acordo com o crescimento semanal e a densidade animal por tratamento.

Essa decomposição se refletiu no forte odor dos tratamentos TR2 e TR3. Esse fator, no entanto, pode não ter sido o único motivo para o odor sulfuroso. Ambos os tratamentos foram os únicos a receber couve, um vegetal rico em compostos de enxofre, especialmente glucosinolatos, que, quando degradados por enzimas ou bactérias, geram substâncias com odor intenso (Marcinkowska & Jeleń, 2020).

O tratamento 4 apresentou uma curva de crescimento gradual e constante ao longo das semanas. Comparado às dietas de ração + couve e somente ração, seu teor de proteína foi menor. No entanto, continha maiores quantidades de cálcio e ágar-ágar. Como a água no experimento tinha pouco cálcio, a maior presença desse mineral na dieta de laboratório parece ter influenciado positivamente tanto o crescimento contínuo quanto a baixa mortalidade. O resultado observado não pode ser atribuído apenas ao nível de proteína bruta (31%), visto que estudos com organismos aquáticos demonstram que o desempenho zootécnico depende do equilíbrio entre proteína e energia, disponibilidade de minerais e estabilidade física da dieta (NRC, 2011; Obaldo et al., 2002). A adição de carbonato de cálcio

provavelmente melhorou a proporção de cálcio e fósforo, favorecendo a mineralização da concha, um fator crucial para gastrópodes (Tanaka et al., 1999). Além disso, como foi fornecida menos ração comercial, a carga de nitrogênio no sistema foi reduzida, promovendo melhor qualidade da água e diminuindo a mortalidade (Boyd, 2015).

Caracós-maçã cultivados em água com dietas com maior disponibilidade de cálcio apresentam crescimento aprimorado e desenvolvem conchas maiores e mais robustas, menos suscetíveis a quebras e erosão. Pesquisas de De Jesús-Navarrete (2023) demonstraram que, para *Pomacea flagellata*, concentrações mais altas de cálcio na água (500 mg/L) resultaram em aumento do tamanho, peso e dureza da concha em comparação com concentrações mais baixas. Da mesma forma, L. Binh et al. (2021) mostraram que, em *Pila polita*, uma dieta contendo aproximadamente 5% de cálcio maximizou o ganho de peso e a produtividade geral. Além disso, a deficiência de cálcio em várias espécies de caramujos demonstrou resultar em conchas finas e frágeis, crescimento atrofiado e aumento da mortalidade (Ireland, 1991; Egonmwan, 2006; Rygało-Galewska, 2023).

Além da dieta, uma variável importante que afeta tanto o crescimento quanto a mortalidade de caramujos-maçã, como *P. figulina*, é a densidade. Estudos anteriores mostraram que densidades superiores a 2 ind./m² afetam negativamente o crescimento de *Pomacea canaliculata* em condições de fluxo de água (Tanaka et al., 1999), enquanto para *Pomacea paludosa*, esses valores foram maiores, chegando a 8 ind./m² para um sistema estático com filtros acionados por ar (Conner et al., 2008). Garr et al. (2010) conseguiram criar com sucesso *Pomacea paludosa* com até 100 ind./m², apresentando um crescimento semanal de 2,5 mm. Os autores atribuíram esse resultado ao sistema artificial de recirculação de água incorporado ao experimento, que impede o acúmulo de metabólitos e outras substâncias químicas liberadas pelos caramujos, que provavelmente inibem o crescimento. No entanto, existe uma lacuna de conhecimento em relação à determinação de uma densidade ideal com base na biomassa animal por volume de água. Neste experimento, a densidade não foi o foco principal e, portanto, não foi avaliada.

Considerando a configuração experimental utilizada, com 3 indivíduos em 1,2 L, é possível afirmar que o sistema funcionou sob uma densidade de estocagem relativamente alta, aproximadamente 3 indivíduos por 0,007 m². Estudos com *Pomacea dolioides* indicam que, em sistemas estáticos com troca regular de água, densidades mais elevadas foram testadas (até 10 indivíduos/L) (Pires-Júnior; Hattori; Sant'Anna, 2019). Outros estudos com as espécies *Pomacea bridgesii* e *Pomacea lineata* apontaram um limite de até 1,5 indivíduos/L (Junior et al., 2013), sendo essa diferença de densidade explicada pela própria espécie, visto que a massa corporal de *Pomacea bridgesii* e *Pomacea lineata* é maior do que a de *Pomacea dolioides* na fase juvenil. No entanto, a falta de padronização metodológica impede a conclusão de uma tolerância intrínseca superior da espécie. Ambos os estudos mostram que,

em experimentos conduzidos em ambientes estáticos, o ideal é calcular a biomassa (gramas) em relação ao volume de água (L).

Portanto, sugerimos que pesquisas futuras investiguem como a densidade e o pH afetam o crescimento, a mortalidade e o desempenho reprodutivo dessa espécie em condições de laboratório. Essas análises contribuirão para aprimorar os protocolos de cultivo, aumentar a confiabilidade dos resultados experimentais e garantir o bem-estar animal.

Conclusão

A dieta influencia diretamente o crescimento e a sobrevivência de *Pomacea figulina* em condições de laboratório. Tanto o Tratamento 1 (ração para peixes) quanto o Tratamento 3, que combina ração para peixes e couve, mostraram-se os mais eficazes na promoção do ganho de massa e comprimento devido à combinação de proteínas e nutrientes presentes na couve. O Tratamento 4 (dieta de laboratório) apresentou crescimento mais modesto, mas destacou-se pela menor taxa de mortalidade, provavelmente devido à suplementação de cálcio. Em contrapartida, o Tratamento 2 (couve) apresentou o pior desempenho, refletindo baixa taxa de crescimento e alta mortalidade, evidenciando que uma dieta composta exclusivamente por vegetais não é recomendada para a manutenção e o cultivo desta espécie em laboratório. Nossos resultados reforçam a importância do equilíbrio nutricional na formulação de dietas experimentais para *P. figulina*, demonstrando que a associação de ração rica em proteínas com fontes vegetais pode otimizar o desempenho biológico de organismos criados em laboratório. Por outro lado, dietas com menor teor proteico apresentaram o pior desempenho em quase todos os parâmetros observados. No entanto, a dieta padrão de laboratório (TR4) diferiu dos demais tratamentos em termos de mortalidade, apresentando a maior taxa de sobrevivência entre os tratamentos e sendo o único parâmetro a apresentar diferença estatisticamente significativa. Além disso, nossos resultados destacam a importância da disponibilidade de cálcio, principalmente quando a água não fornece minerais suficientes para o crescimento da concha.

A padronização de um protocolo de criação em laboratório para *Pomacea figulina* é fundamental para garantir a reprodutibilidade científica, permitindo que essa espécie nativa atue como um bioindicador confiável da saúde do ecossistema. Ao estabelecer parâmetros para dieta, aeração e qualidade da água, o "ruído" de variáveis externas é eliminado, garantindo que as respostas fisiológicas observadas sejam causadas exclusivamente pelos poluentes testados e não pelo estresse de manejo. Além disso, o cultivo controlado respeita a distribuição geográfica original da espécie (focada nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil), fornecendo uma base sólida para comparações, o que é essencial para o monitoramento do impacto a longo prazo de contaminantes e mudanças ambientais sobre a biodiversidade local.

9. ANEXO – B (Material Suplementar – Artigo 1)

This document contains additional information about the analyses performed in the article. It presents the results of statistical tests, growth and mortality calculations, and figures showing each treatment and logistic regression of these behaviors.

Quantity (g)	Ingredients	Nutritional value
60	Portion koi Vibrance	31% Crude Protein, 5% Ether Extract, 1% Calcium and 0.9% Phosphorus. At most, it has 2% Fiber, 7% Moisture and 7% Minerals, in addition to 100mg/kg of Vitamin C.
60	Ground eggshell	98% Calcium carbonate (CaCO ₃)
12	Ágar ágar	0%
120	Distilled water	0%

Table 1 Nutritional composition of the feed prepared in the laboratory for treatment 4. This table contains the quantity (in grams) for one serving, the ingredients, and their nutritional value

Ammonia control for *P.figulina*

Date	Treatment and bottle	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	NH ₄ ⁺ content
4/4/2025	TR1_G3	8.2	23.5	0.25	0.014
	TR2_G3	8.4	22.7	0.50	0.042
	TR3_G3	7.3	22.5	0.25	0.002
	TR4_G3	7.7	22.4	0.50	0.009
4/11/2025	TR1_G1	8.4	23.6	0.50	0.043
	TR2_G1	8.5	23.5	0.50	0.064
	TR3_G1	7.3	22.9	1.00	0.007
	TR4_G1	8.2	22.5	0.25	0.014
4/18/2025	TR1_G2	8.1	22	2	0.111
	TR2_G2	8.1	22	0.5	0.028
	TR3_G2	7.5	21	3.5	0.062
	TR4_G2	8.1	22	0.25	0.014
4/25/2025	TR1_G4	8.4	23.7	0.25	0.032
	TR2_G4	8.3	23.2	0.25	0.022
	TR3_G4	7.3	23.1	0.5	0.006
	TR4_G4	8.4	23.3	0.25	0.032

5/2/2025	TR1_G4	8.4	23.3	0.25	0.032
	TR2_G4	8.3	23.5	0.25	0.022
	TR3_G4	7.3	22.9	0.5	0.006
	TR4_G4	8.4	23.2	0.25	0.032

Table 2 Physicochemical parameters measured across treatments TR1 to TR4 within bottles G1, G2, G3, and G4. The table reports pH, temperature (°C), experimental concentration (units according to methodological specification), and the corresponding rate values obtained for each treatment. Each row represents an independent experimental treatment conducted under standardized environmental and methodological conditions, allowing for comparative assessment across groups and concentration levels: Green Zone (Safe): Ammonia close to zero ppm (0.00 - 0.1 ppm), Yellow Zone (Caution): Levels starting to rise (0.25 ppm), Red Zone (Danger/Toxic): High levels (above 0.5 ppm or more, depending on pH/temperature).

	N total	N missing	Mean	Standard Deviation	SE of mean	Sum	Minimum	Median	Maximum
TR1	91	19	1.82671	2.09352	0.21946	166.23098	0.01093	0.9349	8.1096
TR2	68	42	0.24879	0.31094	0.03771	16.91742	0.01	0.1247	1.4108
TR3	86	24	1.90917	2.19539	0.23674	164.18873	0.00957	0.94793	8.2558
TR4	110	0	0.89466	0.81798	0.07799	98.41235	0.00963	0.65985	3.0059

Table 3 Descriptive statistics of the weight of individuals in treatments TR1, TR2, TR3, and TR4 used in the Kruskal-Wallis test. The table presents, for each treatment, the total number of observations, the mean, the standard deviation, the sum of the values, the minimum body mass, the median, and the maximum body mass recorded. These descriptors summarize the distribution characteristics of each treatment group and corroborate the non-parametric comparison performed using the Kruskal-Wallis procedure.

Input Data

	Data	Range
TR1	[Book1]WEIGHT!A"TR1"	[1*:110*]
TR2	[Book1]WEIGHT!B"TR2"	[1*:110*]
TR3	[Book1]WEIGHT!C"TR3"	[1*:110*]
TR4	[Book1]WEIGHT!D"TR4"	[1*:110*]

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Q3	Max
"TR1"	91	0.01093	0.0771	0.110	0.110
"TR2"	68	0.01	0.02599	0.110	0.110
"TR3"	86	0.00957	0.0543	0.110	0.110
"TR4"	110	0.00963	0.13281	0.110	0.110

Ranks

	N	Mean Rank	Sum Rank
"TR1"	91	203.32967	18503
"TR2"	68	112.13235	7625
"TR3"	86	199.7907	17182
"TR4"	110	180.72727	19880

Test Statistics

Chi-Square	DF	Prob>Chi
37.51166	3	

Null Hypothesis: The samples come from the same population.
 Alternative Hypothesis: The samples come from different populations.

At the 0.05 level, the populations are significantly different.

Dunn's Test

	Mean Rank Diff	Z	Prob
"TR1" "TR2"	91.19732	5.54383	<0.0001
"TR1" "TR3"	3.53897	0.2293	1
"TR1" "TR4"	22.6024	1.55427	0.72073
"TR2" "TR3"	-87.65834	-5.26366	<0.0001
"TR2" "TR4"	-68.59492	-4.33296	<0.0001
"TR3" "TR4"	19.06342	1.29054	1

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is NOT significant at the 0,05 level.

Paired Comparison Plot

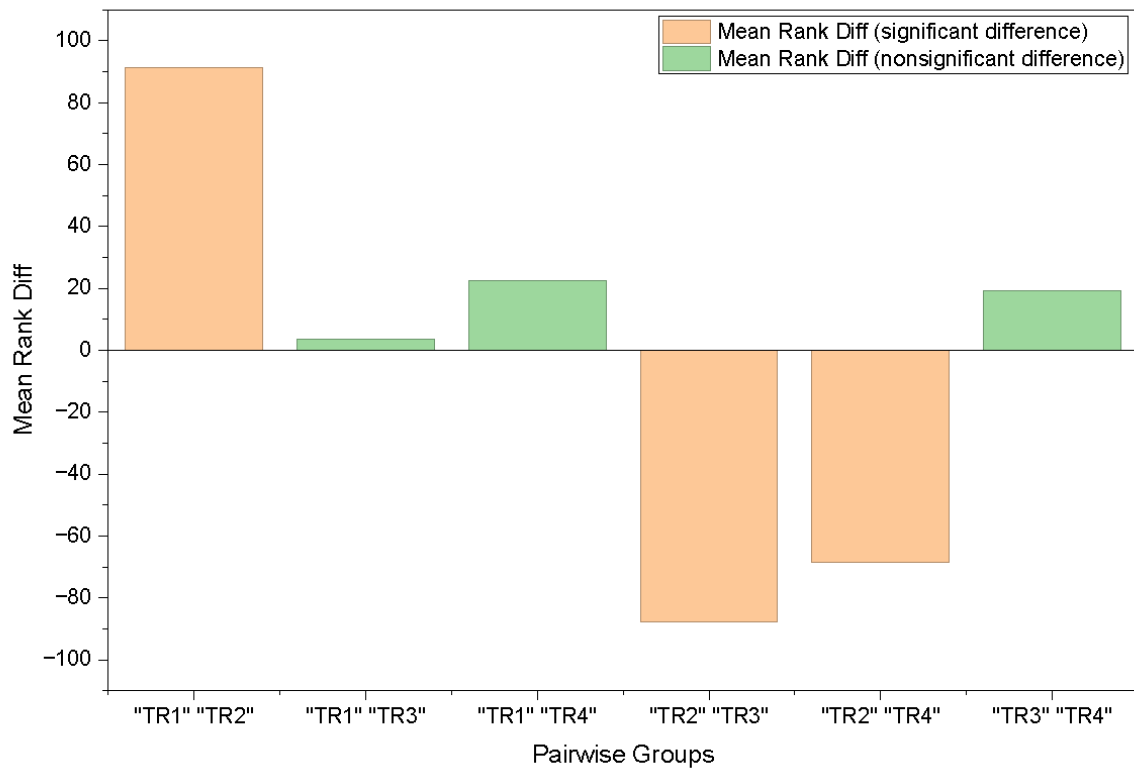


Fig. 1 Results of the Kruskal–Wallis analysis comparing individual body mass across the four treatments (TR1–TR4). The figure includes descriptive statistics, rank distributions, overall test statistics, and Dunn’s post hoc comparisons. Significant pairwise differences are indicated at the 0.05 level, highlighting the treatment combinations that differ in median body mass.

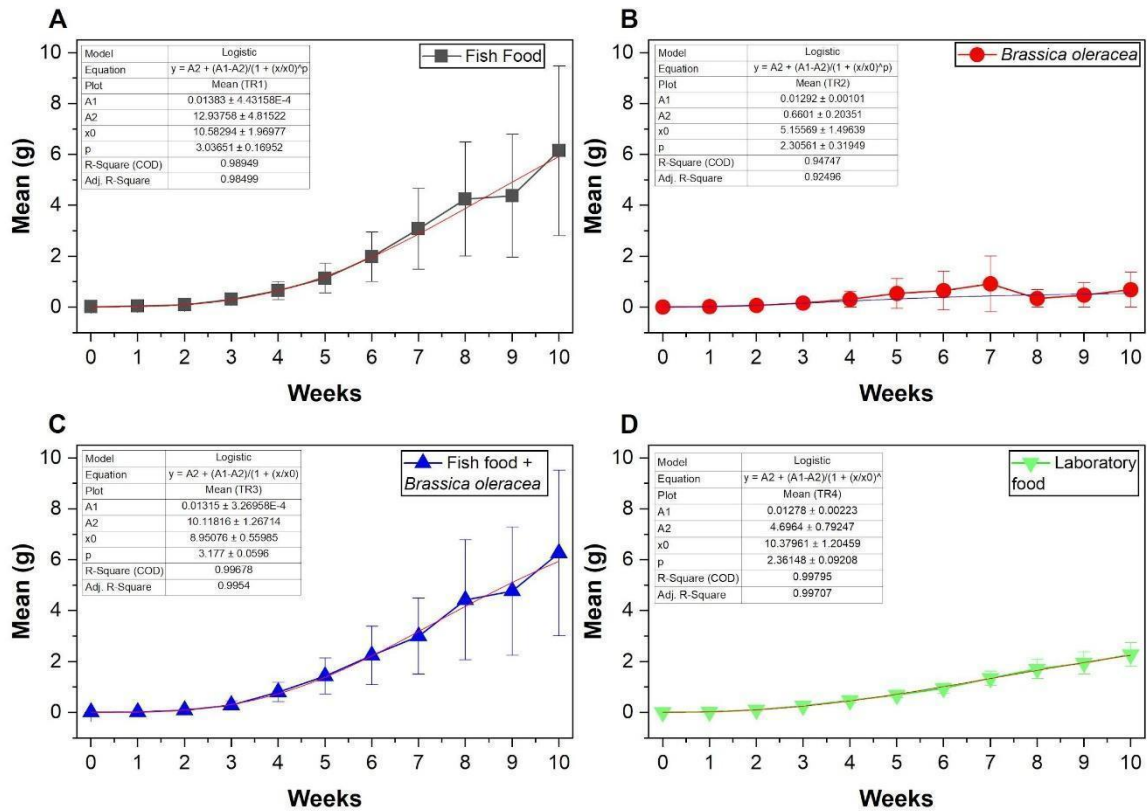


Fig. 2 Mean weight (\pm standard deviation) of *P. figulina* over 10 weeks, under different experimental diets, with logistic adjustment. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet. The red curves represent the fit of the logistic model to the experimental data. The estimated model parameters (A1, A2, X₀ and p), the coefficient of determination (R²) and the reduced chi-square (χ^2) are presented in each subgraph.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:15:32)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
Mean (TR1)	A1	0.01383	4.43158E-4	31.20972	8.9551E-9	0.0025
	A2	12.93758	4.81522	2.68681	0.03123	0.98908
	x0	10.58294	1.96977	5.37267	0.00104	0.99301
	p	3.03651	0.16952	17.91248	4.17367E-7	0.91358
	EC20	6.70398	1.09862			
	EC50	10.58294	1.96977			
	EC80	16.70629	3.49359			
	EC10	5.13275	0.77676			
	EC90	21.82039	4.86201			

Reduced Chi-sqr = 0.0468498089582

COD(R²) = 0.98948995720288

Iterations Performed = 6

Total Iterations in Session = 6

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR1)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.04685
Residual Sum of Squares	0.32795
R-Square (COD)	0.98949
Adj. R-Square	0.98499
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

	A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
	Standar Value	Standar Error	Standar Value	Standar Error	Standar Value	Standar Error	Standar Value	Standar Error	Standar Value	Standar Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square								
Mean (TR1)	0.0138 3	4.4315 8E-4	12.937 58	4.8152 2	10.582 94	1.9697 7	3.0365 1	0.1695 2	6.7039 8	1.0986 2	10.582 94	1.9697 7	16.706 29	3.4935 9	5.1327 5	0.7767 6	21.820 39	4.8620 1	0.0468 5	0.9849 9

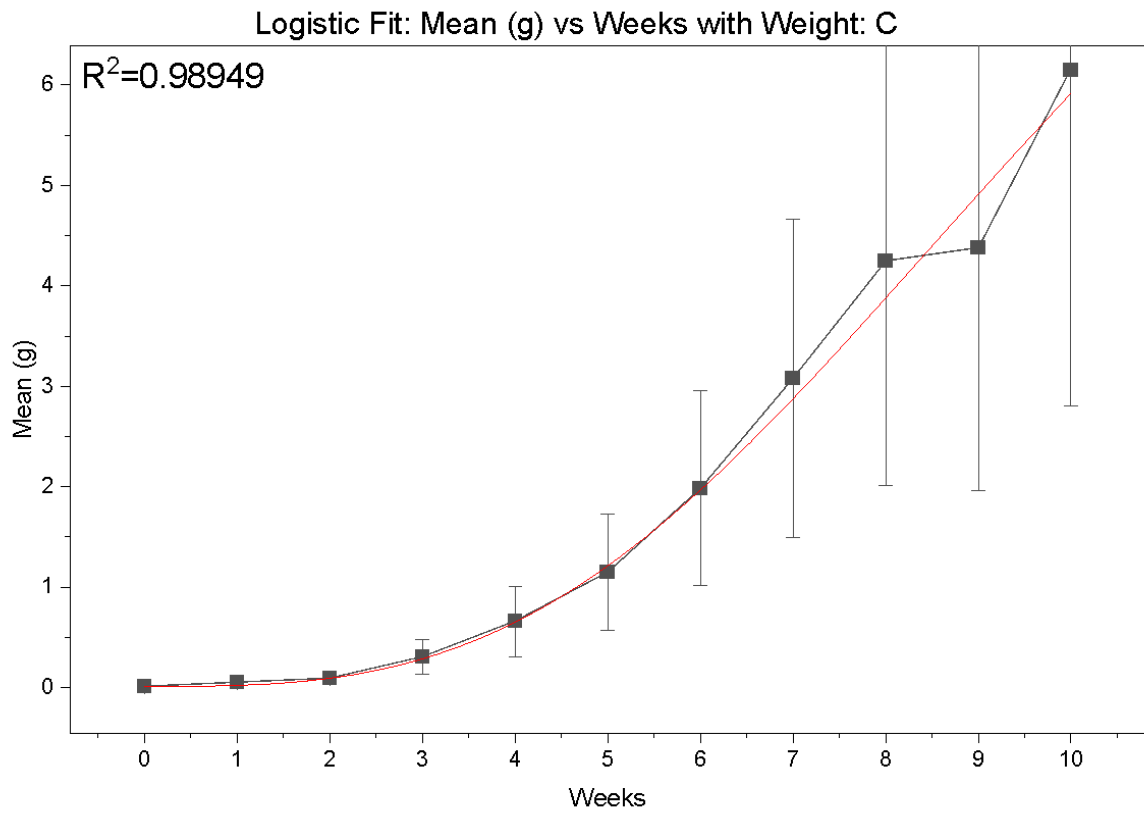
ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR1)	Regression	4	78.43973	19.60993	418.57017	<0.0001
	Residual	7	0.32795	0.04685		
	Uncorrected Total	11	78.76768			
	Corrected Total	10	31.20336			

Mean (TR1): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=0.

Mean (TR1): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=0.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

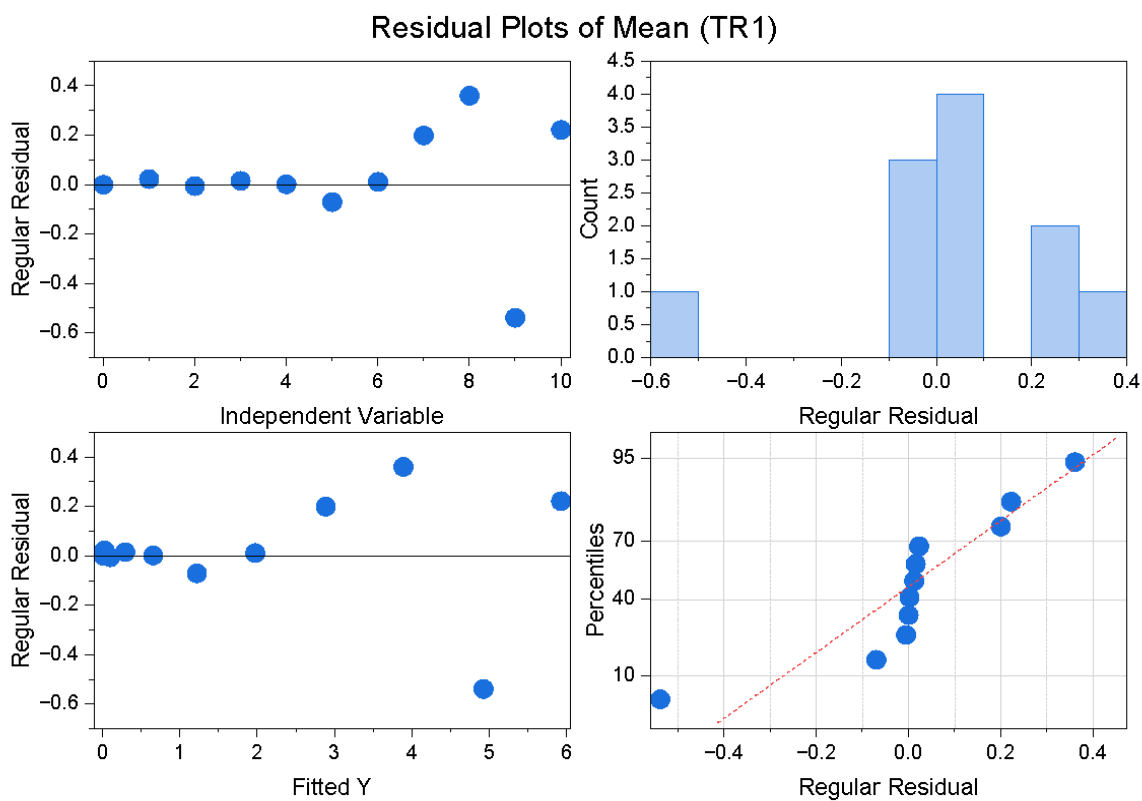


Fig. 3 Nonlinear logistic curve fit for weight Treatment 1 (fish food), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:47:02)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
Mean (TR2)	A1	0.01292	0.00101	12.83724	4.03871E-6	0.12805
	A2	0.6601	0.20351	3.24361	0.01418	0.92471
	x0	5.15569	1.49639	3.44541	0.01076	0.97241
	p	2.30561	0.31949	7.21661	1.74915E-4	0.91545
	EC20	2.82591	0.61849			
	EC50	5.15569	1.49639			
	EC80	9.40622	3.44918			
	EC10	1.98796	0.36157			
	EC90	13.37104	5.51751			

Reduced Chi-sqr = 0.113055200828

COD(R^2) = 0.94747217024446

Iterations Performed = 11

Total Iterations in Session = 11

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR2)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.11306
Residual Sum of Squares	0.79139
R-Square (COD)	0.94747
Adj. R-Square	0.92496
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

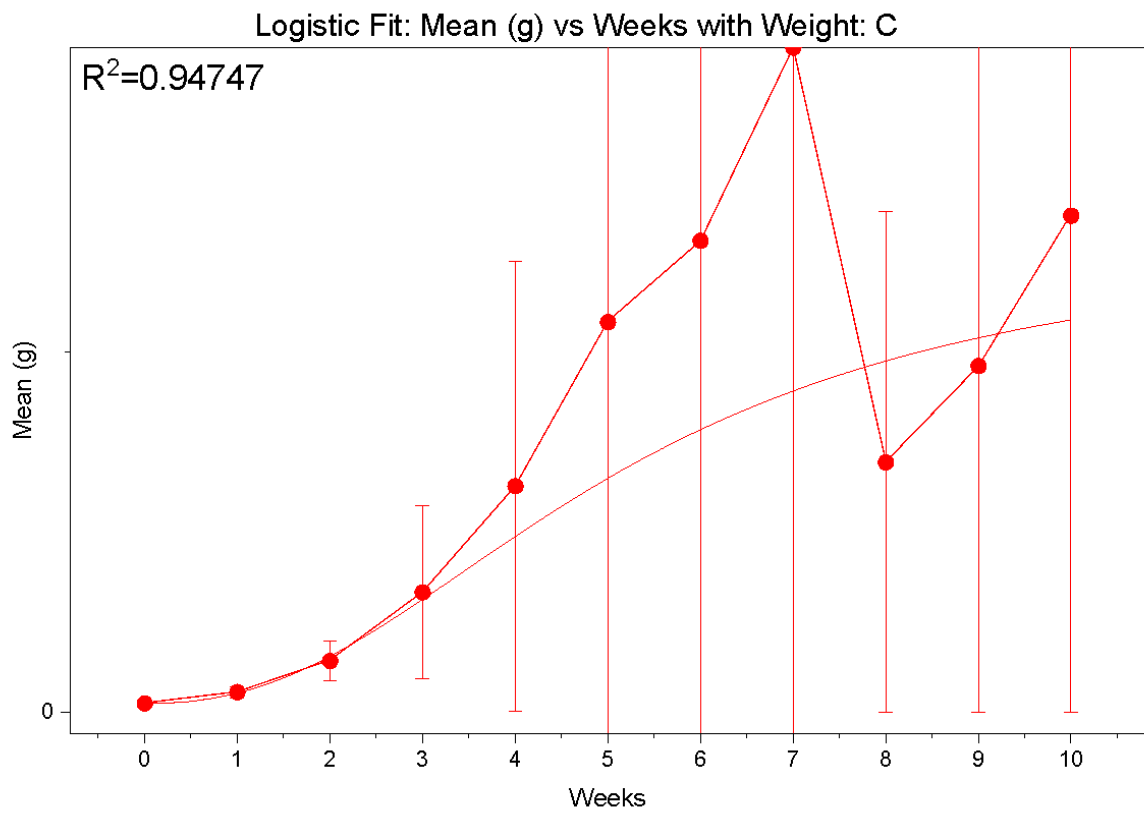
A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square								
Mean	0.012	0.660	0.20351	5.155	1.4963	2.305	0.3194	2.825	0.6184	5.155	1.4963	9.406	3.4491	1.987	0.3615	13.371	5.5175	0.1130	0.924
(TR2)	92	1		69	9	61	9	91	9	69	9	22	8	96	7	04	1	6	96

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR2)	Regression	4	45.57879	11.3947	100.7888	<0.0001
	Residual	7	0.79139	0.11306		
	Uncorrected Total	11	46.37018			
	Corrected Total	10	15.06604			

Mean (TR2): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=0.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

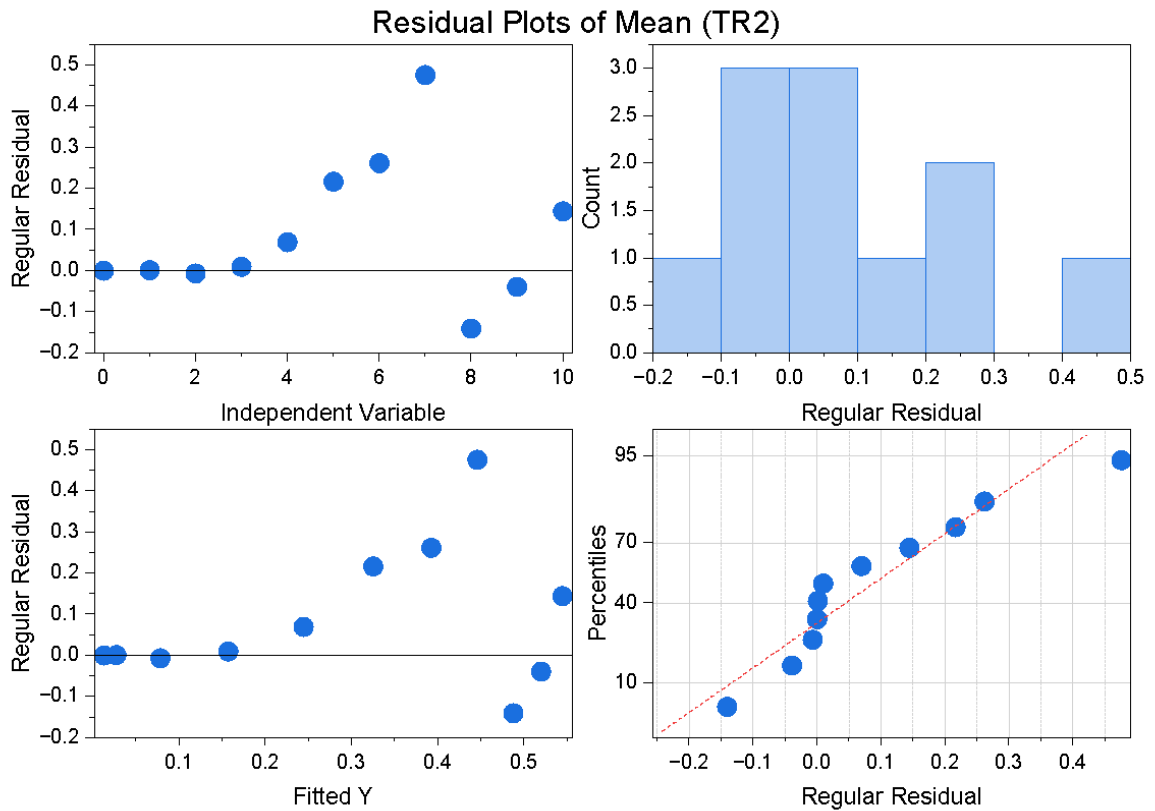


Fig. 4 Nonlinear logistic curve fit for weight Treatment 2 (*Brassica oleracea*), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:19:23)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t 	Dependency
Mean (TR3)	A1	0.01315	3.26958E-4	40.22982	1.52794E-9	0.17298
	A2	10.11816	1.26714	7.98503	9.22458E-5	0.97151
	x0	8.95076	0.55985	15.98776	9.09386E-7	0.98264
	p	3.177	0.0596	53.30687	2.14274E-10	0.86933
	EC20	5.78568	0.32289			
	EC50	8.95076	0.55985			
	EC80	13.84732	0.96375			
	EC10	4.4823	0.23334			
	EC90	17.8739	1.31966			

Reduced Chi-sqr = 0.0174309076936

COD(R²) = 0.99677676299706

Iterations Performed = 6

Total Iterations in Session = 6

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR3)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.01743
Residual Sum of Squares	0.12202
R-Square (COD)	0.99678
Adj. R-Square	0.9954
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

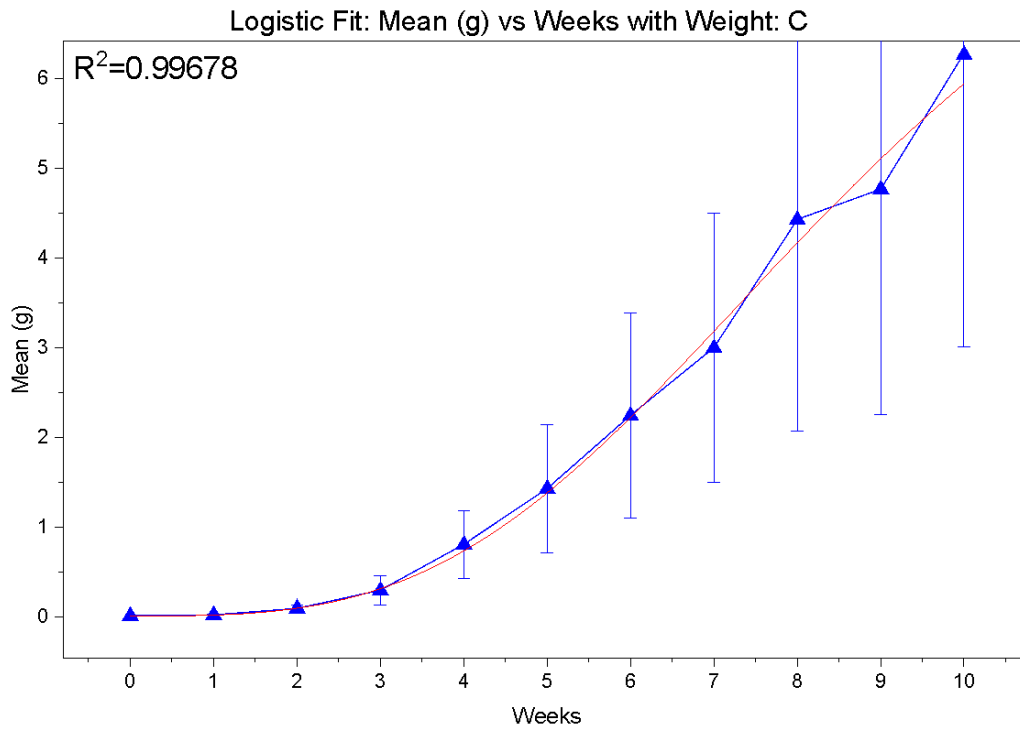
	A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square								
Mean (TR3)	0.01315	3.26958E-4	10.11816	1.26714	8.95076	0.55985	3.177	0.0596	5.78568	0.32289	8.95076	0.55985	13.84732	0.96375	4.4823	0.23334	17.8739	1.31966	0.01743	0.9954

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR3)	Regression	4	85.72209	21.43052	1229.45535	<0.0001
	Residual	7	0.12202	0.01743		
	Uncorrected Total	11	85.84411			
	Corrected Total	10	37.85522			

Mean (TR3): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=0.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

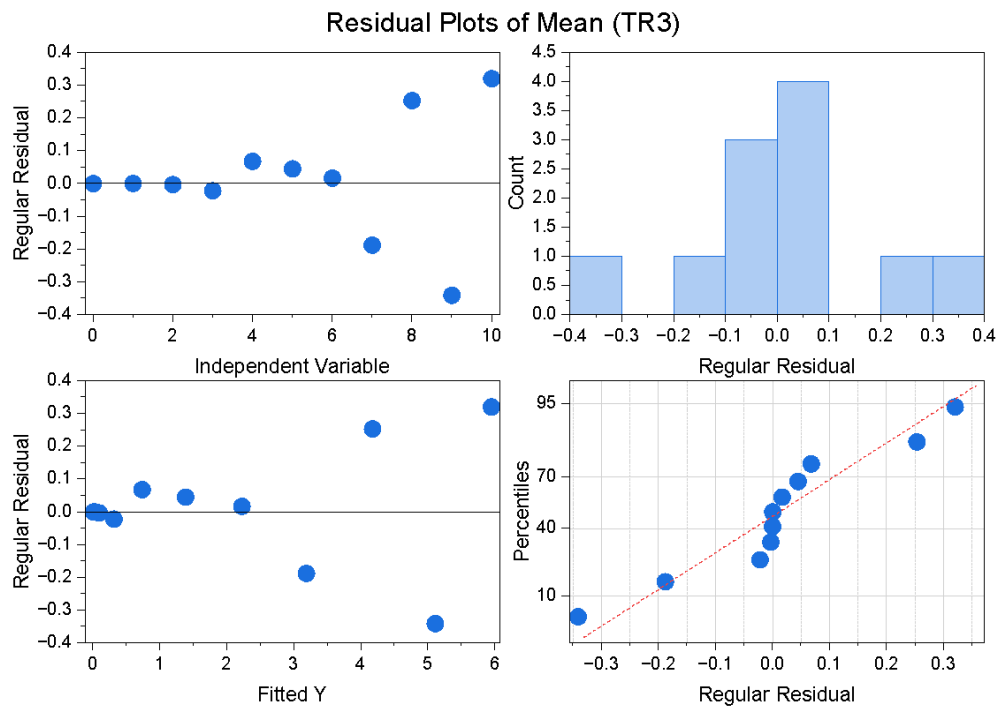


Fig. 5 Nonlinear logistic curve fit for weight Treatment 3 (*Brassica oleracea* + fish food), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A1, A2, X₀, p, and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:19:53)**

Parameters		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t 	Dependency
Mean (TR4)	A1	0.01278	0.00223	5.74075	7.05091E-4	0.56952
	A2	4.6964	0.79247	5.9263	5.838E-4	0.99064
	x0	10.37961	1.20459	8.61673	5.65635E-5	0.99426
	p	2.36148	0.09208	25.64624	3.5019E-8	0.94828
	EC20	5.77073	0.55322			
	EC50	10.37961	1.20459			
	EC80	18.66944	2.55943			
	EC10	4.0935	0.34671			
	EC90	26.3189	3.93865			

Reduced Chi-sqr = 0.0557432880033

COD(R²) = 0.99794976183057

Iterations Performed = 7

Total Iterations in Session = 7

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR4)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.05574
Residual Sum of Squares	0.3902
R-Square (COD)	0.99795
Adj. R-Square	0.99707
Fit Status	Succeeded(100)
Fit Status Code :	

Summary

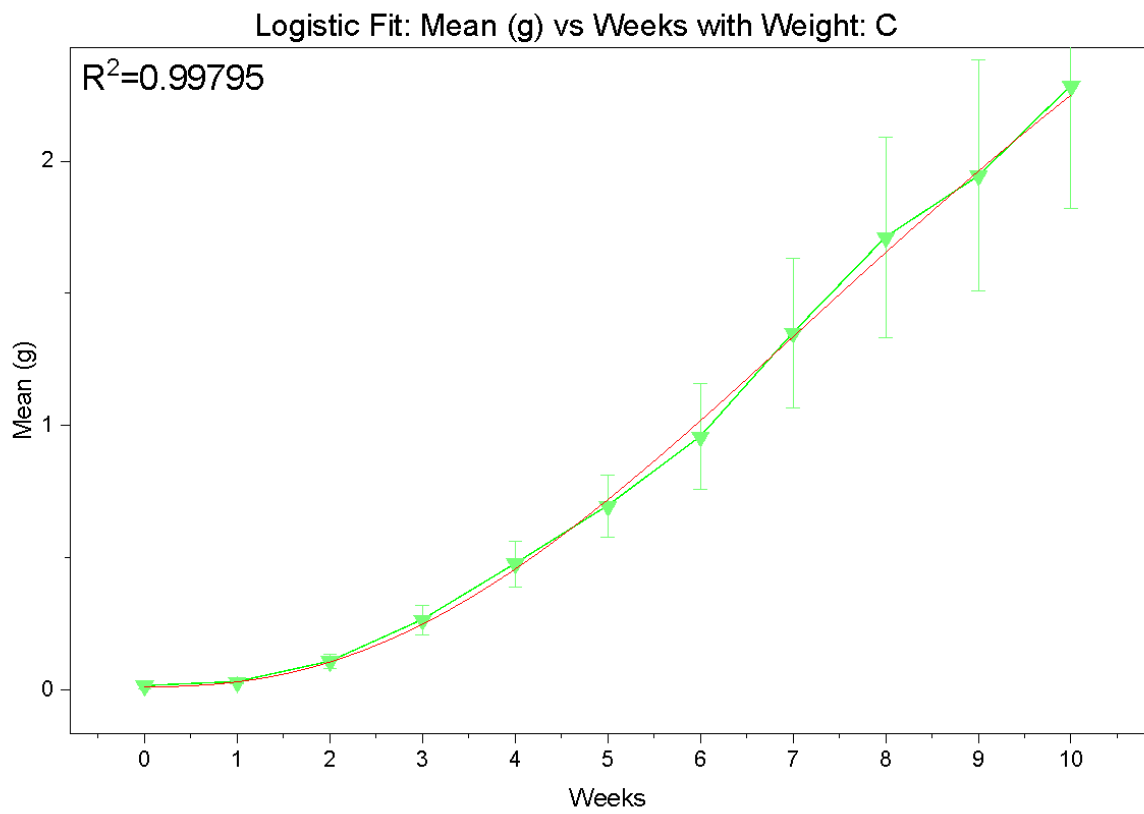
A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics											
Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square	
Mean (TR4)	0.01278	0.00223	4.6964	0.79247	10.37961	1.20459	2.36148	0.09208	5.77073	0.55322	10.37961	1.20459	18.66944	2.55943	4.0935	0.34671	26.3189	3.93865	0.05574	0.99707

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR4)	Regression	4	229.97148	57.49287	1031.38643	<0.0001
	Residual	7	0.3902	0.05574		
	Uncorrected Total	11	230.36169			
	Corrected Total	10	190.32082			

Mean (TR4): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function y=0.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

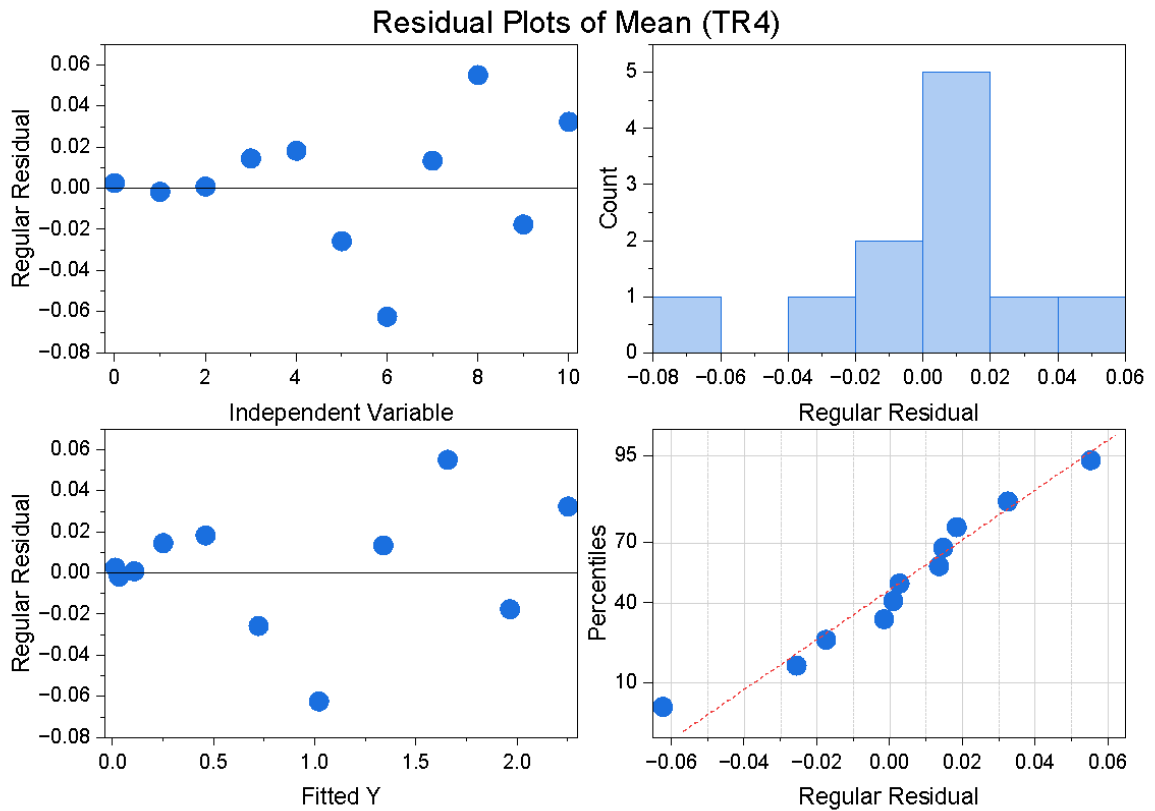


Fig. 6 Nonlinear logistic curve fit for weight Treatment 4 (standard laboratory diet), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

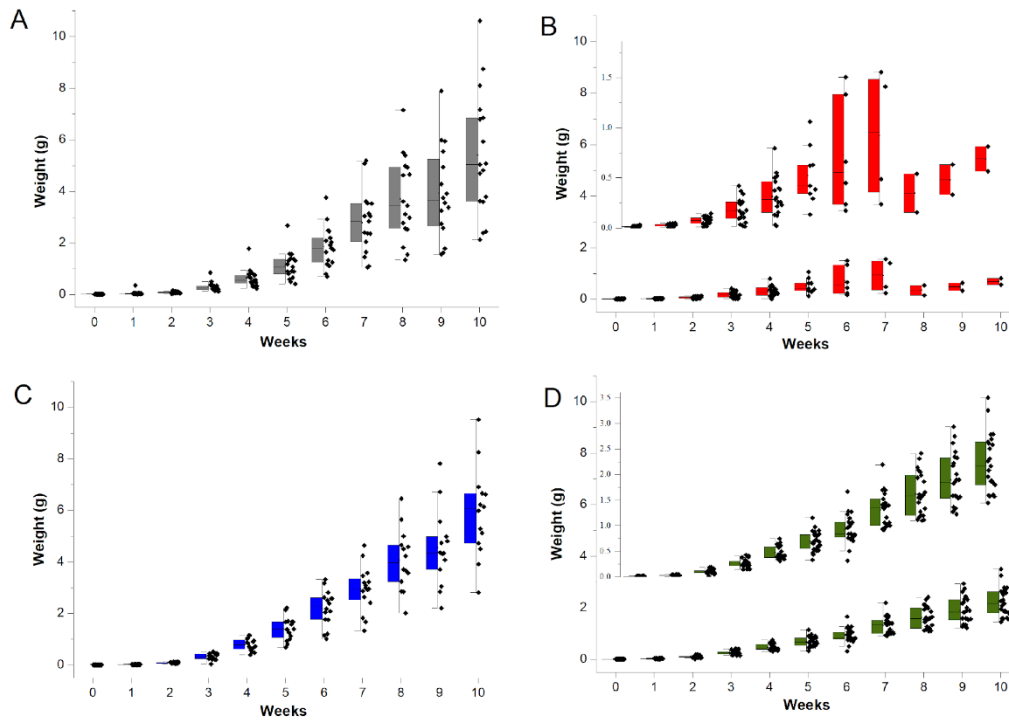


Fig. 7 Variation in the weight of *P. figulina* (in grams) over 10 weeks under different feeding regimes. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet.

	N total	N missing	Mean	Standard Deviation	SE of mean	Sum	Minimum	Median	Maximum
TR1	91	19	14.77074	8.75761	0.93891	1285.05417	2.524	14.39	33.79
TR2	68	42	8.44759	4.37344	0.54246	549.09317	0	7.675	18
TR3	86	24	15.30266	9.0688	0.99543	1270.12067	2.344	15.18333	33.345
TR4	110	0	13.0022	5.78247	0.55134	1430.24233	2.402	13.44333	23.44

Table 4 Descriptive statistics of the size of individuals in treatments TR1, TR2, TR3, and TR4 used in the Kruskal-Wallis test. The table presents, for each treatment, the total number of observations, the mean, the standard deviation, the sum of the values, the minimum body mass, the median, and the maximum body mass recorded. These descriptors summarize the distribution characteristics of each

treatment group and corroborate the non-parametric comparison performed using the Kruskal-Wallis procedure.

Kruskal-Wallis ANOVA (01/03/2026 14:16:00)

Notes

X-Function	Kruskal-Wallis ANOVA
User Name	Lenovo
Time	01/03/2026 14:16:00
Data Filter	No

Input Data

Data	Range
TR1 [Book1]SIZE!A"TR1" [1*:110*]	
TR2 [Book1]SIZE!B"TR2" [1*:110*]	
TR3 [Book1]SIZE!C"TR3" [1*:110*]	
TR4 [Book1]SIZE!D"TR4" [1*:110*]	

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
"TR1"	87	2.524	6.23	14.39	22	33.79
"TR2"	65	0	5.26333	7.675	12.26	18
"TR3"	83	2.344	6.124	15.18333	23.865	33.345
"TR4"	110	2.402	8.05875	13.44333	17.70625	23.44

Ranks

	N	Mean Rank	Sum Rank
"TR1"	87	190.18391	16546
"TR2"	65	113.47692	7376
"TR3"	83	196.22289	16286.5
"TR4"	110	177.05909	19476.5

Test Statistics

Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
30.41565	3	<0.0001

Null Hypothesis: The samples come from the same population.

Alternative Hypothesis: The samples come from different populations.

At the 0.05 level, the populations are significantly different.

Dunn's Test

	Mean Rank Diff	Z	Prob	Sig
"TR1" "TR2"	76.70698	4.69108	<0.0001	1
"TR1" "TR3"	-6.03898	-0.39462	1	0
"TR1" "TR4"	13.12482	0.91719	1	0
"TR2" "TR3"	-82.74597	-5.00905	<0.0001	1
"TR2" "TR4"	-63.58217	-4.07486	2.76252E-4	1

"TR3" "TR4"	19.1638	1.32154	1	0
-------------	---------	---------	---	---

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of the means is NOT significant at the 0,05 level.

Paired Comparison Plot

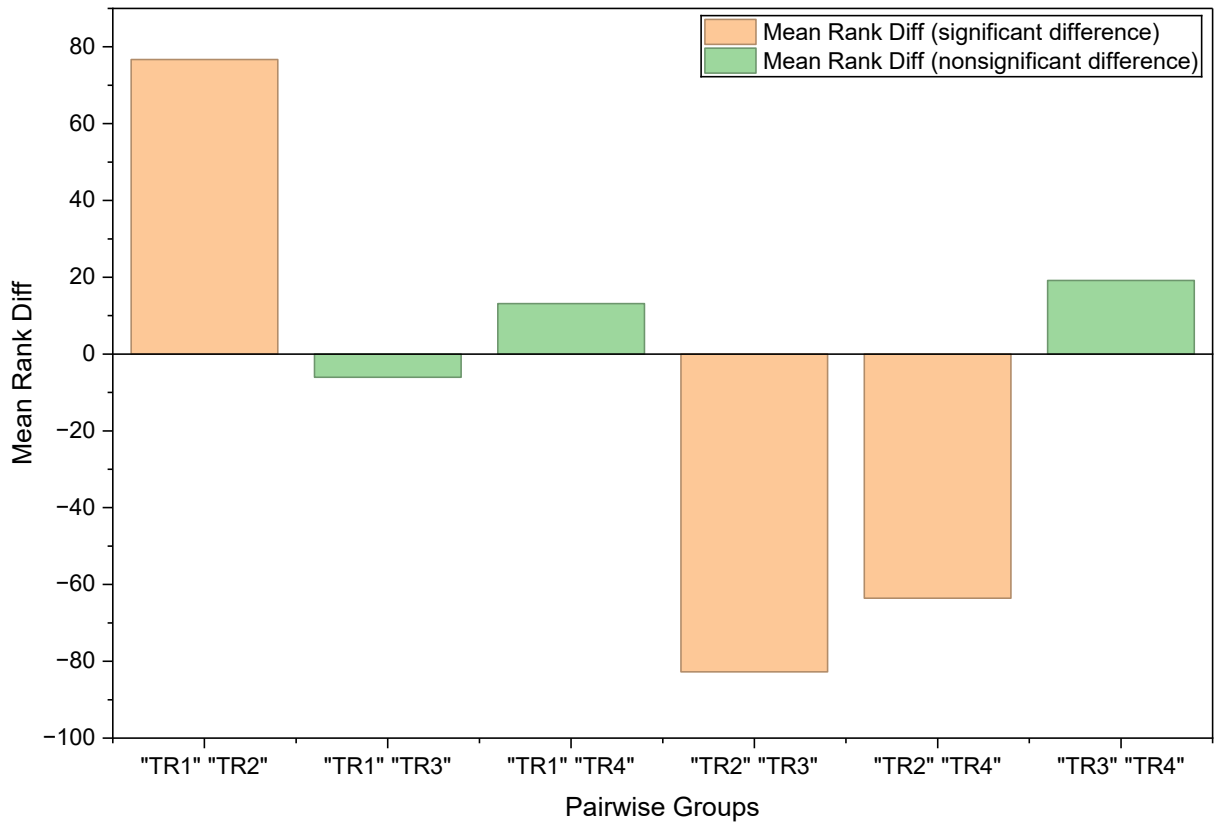


Fig. 8 Results of the Kruskal–Wallis analysis comparing individual size across the four treatments (TR1–TR4). The figure includes descriptive statistics, rank distributions, overall test statistics, and Dunn’s post hoc comparisons. Significant pairwise differences are indicated at the 0.05 level, highlighting the treatment combinations that differ in median size.

Treatments	Initial mean	Final mean	Weekly rate	Weekly growth rate (%)
TR1	2.822	26.96	2.41	85.560
TR2	2.776	13.65	1.09	39.171
TR3	2.772	29.15	2.64	95.158
TR4	2.720	20.43	1.77	65.108

Table 5. Weekly growth performance of individuals in treatments TR1, TR2, TR3, and TR4. The table presents the initial and final average body mass, the weekly absolute growth rate, and the weekly percentage growth rate for each treatment, summarizing the growth dynamics observed throughout the experimental period.

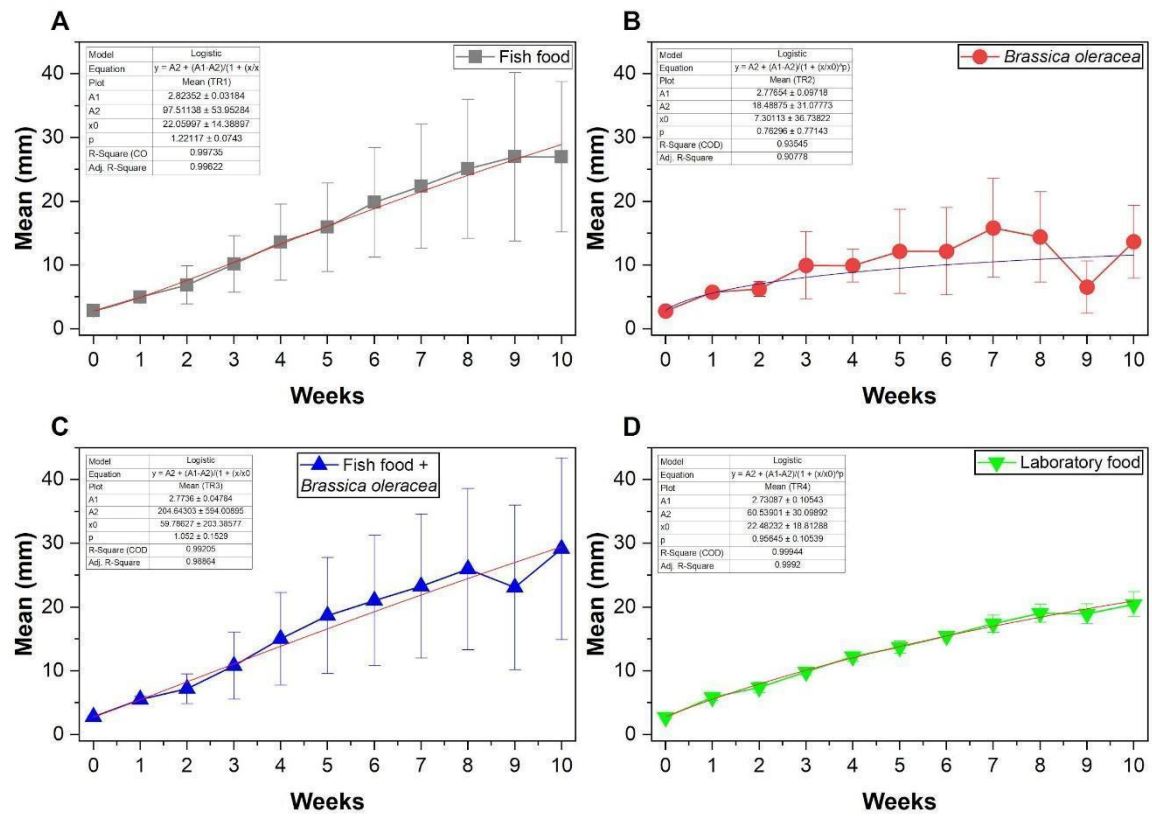


Fig. 9 Average size (\pm standard deviation) of *P. figulina* over 10 weeks, under different experimental diets, with logistic adjustment. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet. The red curves represent the fit of the logistic model to the experimental data. The estimated model parameters (A1, A2, X_0 and p), the coefficient of determination (R^2) and the reduced chi-square (χ^2) are presented in each subgraph.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:20:35)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
Fish food	A1	2.82352	0.03184	88.67914	6.10693E-12	0.24415
	A2	97.51138	53.95284	1.80734	0.11366	0.99902
	x0	22.05997	14.38897	1.53312	0.16911	0.99938
	p	1.22117	0.0743	16.43489	7.53058E-7	0.98857
	EC20	7.08904	4.15183			
	EC50	22.05997	14.38897			
	EC80	68.64713	49.37999			
	EC10	3.64914	1.99607			
	EC90	133.358	101.18246			

Reduced Chi-sqr = 0.0185066167531

COD(R^2) = 0.99735395668259

Iterations Performed = 16

Total Iterations in Session = 16

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Fish food
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.01851
Residual Sum of Squares	0.12955
R-Square (COD)	0.99735
Adj. R-Square	0.99622
Fit Status	Succeeded(100)

Summary

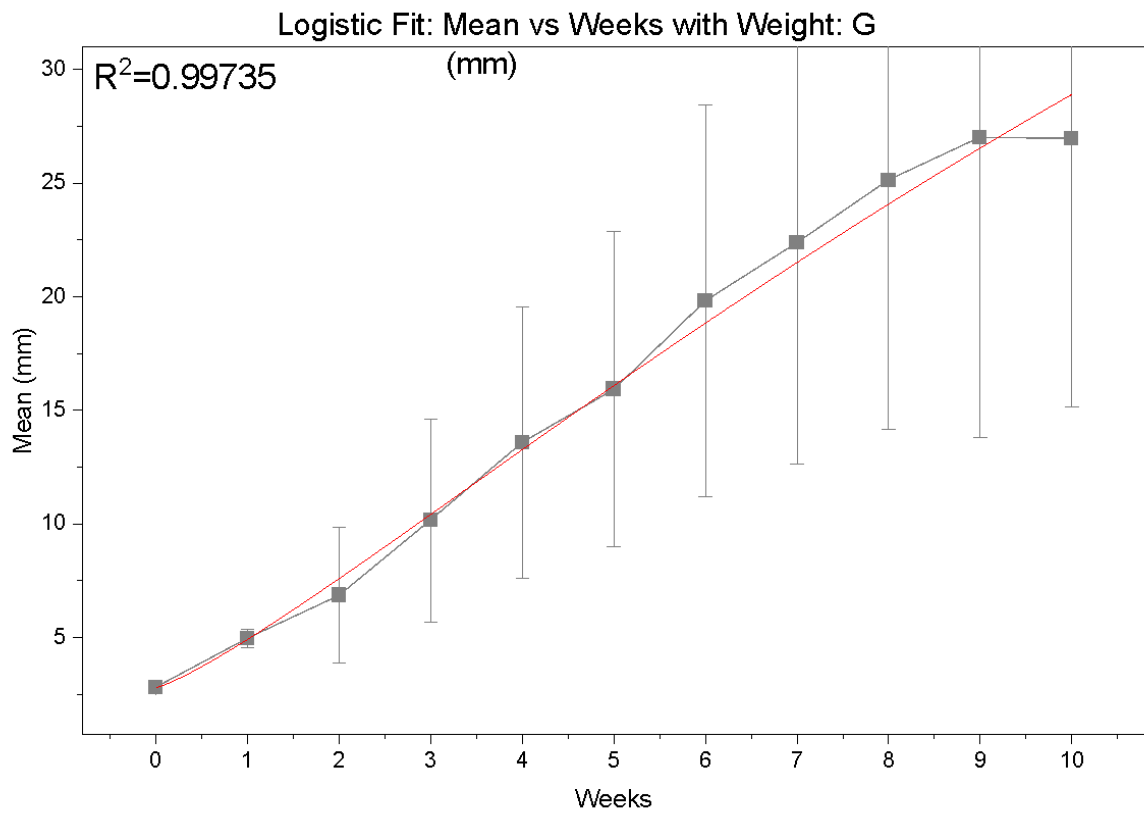
A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square						
Fish food (TR1)	0.03184	97.51138	53.95284	22.05997	14.38897	1.22117	0.0743	7.08904	4.15183	22.05997	14.38897	68.64713	49.37999	3.64914	1.99607	133.358	101.18246	0.01851	0.99622

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Fish food	Regression	4	337.9601	84.49003	4565.39551	<0.0001
	Residual	7	0.12955	0.01851		
	Uncorrected Total	11	338.08965			
	Corrected Total	10	48.9585			

Fish food: At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function $y=0$.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

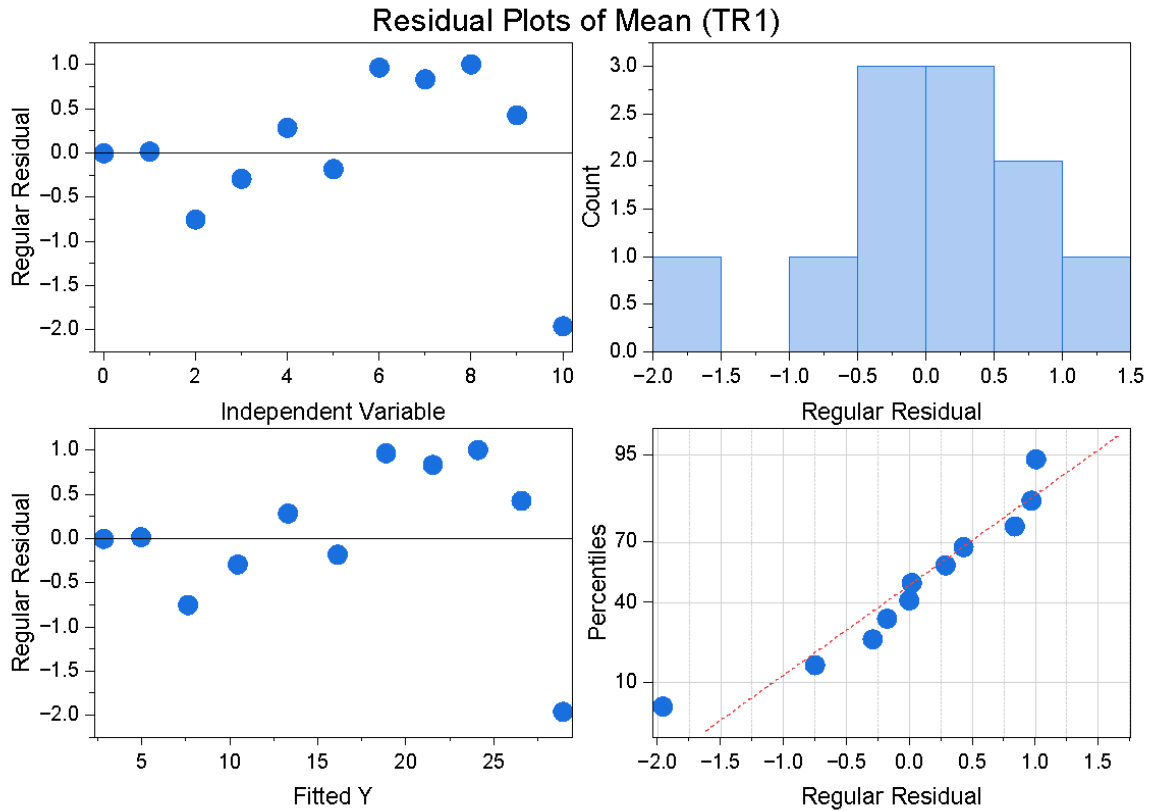


Fig.10 Nonlinear logistic curve fit for size Treatment 1 (fish food), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:47:46)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t 	Dependency
Mean (TR2)	A1	2.77654	0.09718	28.57154	1.65464E-8	0.04094
	A2	18.48875	31.07773	0.59492	0.57062	0.99763
	x0	7.30113	36.73822	0.19873	0.84812	0.99874
	p	0.76296	0.77143	0.98902	0.3556	0.98772
	EC20	1.18653	3.85218			
	EC50	7.30113	36.73822			
	EC80	44.92652	307.50566			
	EC10	0.4099	0.91881			
	EC90	130.04814	1028.71505			

Reduced Chi-sqr = 0.45469478433

COD(R²) = 0.93544939256686

Iterations Performed = 17

Total Iterations in Session = 17

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR2)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.45469
Residual Sum of Squares	3.18286
R-Square (COD)	0.93545
Adj. R-Square	0.90778
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

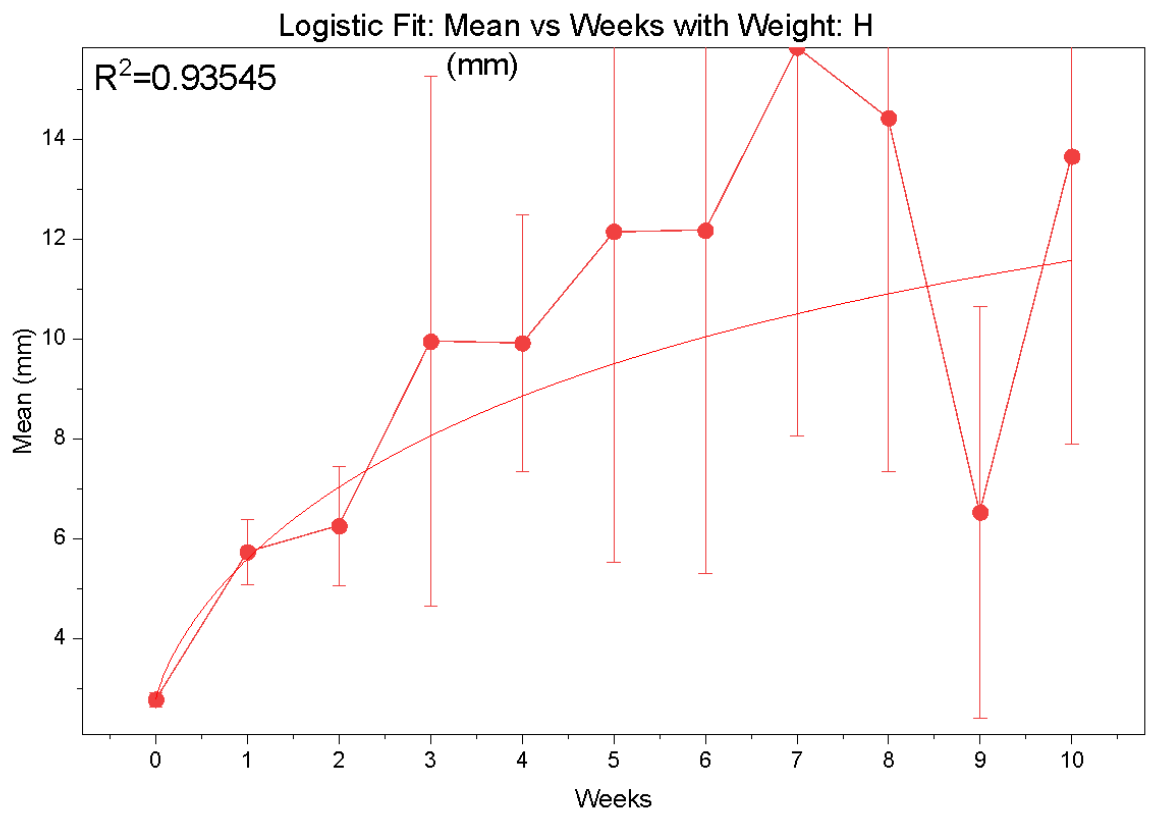
	A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square						
Mean (TR2)	2.77654	0.09718	18.48875	31.07773	7.30113	36.73822	0.76296	0.77143	1.18653	3.85218	7.30113	36.73822	44.92652	307.50566	0.4099	0.91881	130.04814	1028.71505	0.45469	0.90778

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR2)	Regression	4	513.16863	128.29216	282.15005	<0.0001
	Residual	7	3.18286	0.45469		
	Uncorrected Total	11	516.35149			
	Corrected Total	10	49.30803			

Mean (TR2): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function $y=0$.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

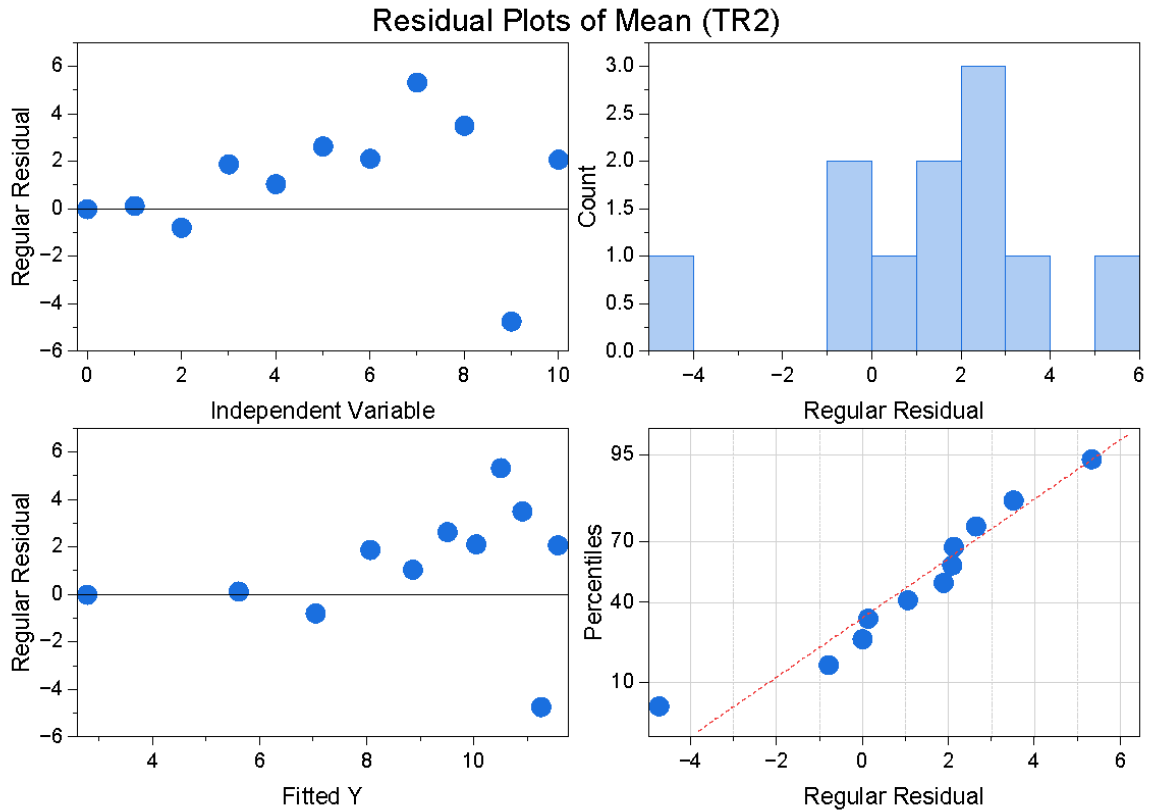


Fig. 11 Nonlinear logistic curve fit for weight Treatment 2 (*Brassica oleracea*), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:21:37)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
Mean (TR3)	A1	2.7736	0.04784	57.97964	1.19134E-10	0.15303
	A2	204.64303	594.00895	0.34451	0.74058	0.99988
	x0	59.78627	203.38577	0.29396	0.77732	0.99991
	p	1.052	0.1529	6.88028	2.35469E-4	0.99629
	EC20	16.00674	51.46804			
	EC50	59.78627	203.38577			
	EC80	223.30583	801.42123			
	EC10	7.40508	23.00459			
	EC90	482.69553	1785.25227			

Reduced Chi-sqr = 0.0654760255431

COD(R²) = 0.99204790143095

Iterations Performed = 41

Total Iterations in Session = 41

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR3)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.06548
Residual Sum of Squares	0.45833
R-Square (COD)	0.99205
Adj. R-Square	0.98864
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

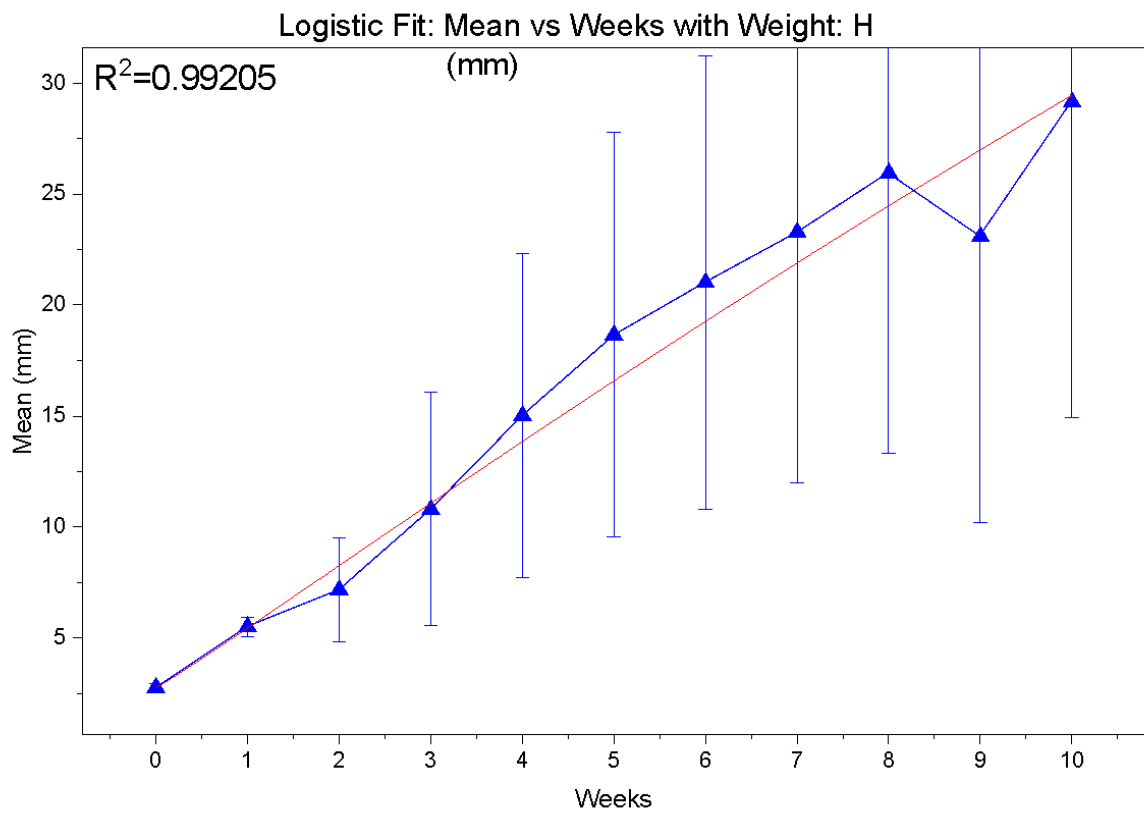
	A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square								
Mean (TR3)	2.7736	0.04784	204.64303	594.00895	59.78627	203.38577	1.052	0.1529	16.00674	51.46804	59.78627	203.38577	223.30583	801.42123	7.40508	23.00459	482.69553	1785.25227	0.06548	0.98864

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR3)	Regression	4	414.534	103.6335	1582.77016	<0.0001
	Residual	7	0.45833	0.06548		
	Uncorrected Total	11	414.99233			
	Corrected Total	10	57.63663			

Mean (TR3): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function $y=0$.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

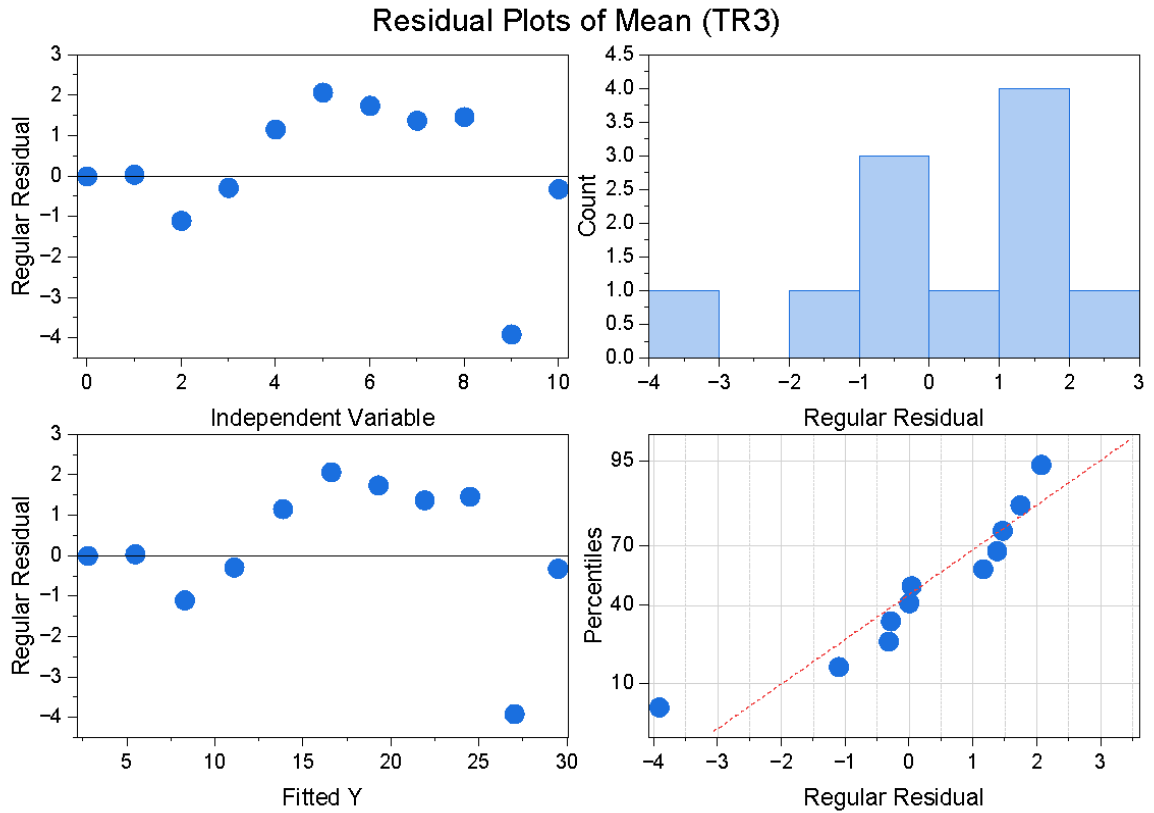


Fig. 12 Nonlinear logistic curve fit for size Treatment 3 (*Brassica oleracea* + fish food), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

**Nonlinear Curve Fit (Logistic) (27/02/2026
15:22:00)**

Parameters

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
Mean (TR4)	A1	2.73087	0.10543	25.90109	3.26981E-8	0.7183
	A2	60.53901	30.09892	2.01133	0.0842	0.99993
	x0	22.48232	18.81288	1.19505	0.27098	0.99995
	p	0.95645	0.10539	9.07508	4.04121E-5	0.99852
	EC20	5.27673	3.61315			
	EC50	22.48232	18.81288			
	EC80	95.78941	94.95133			
	EC10	2.26019	1.35079			
	EC90	223.63387	242.04205			

Reduced Chi-sqr = 0.233482189748

COD(R²) = 0.9994406230003

Iterations Performed = 16

Total Iterations in Session = 16

Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.

EC20, EC50, EC80, EC10, EC90 are derived parameter(s).

Statistics

	Mean (TR4)
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	0.23348
Residual Sum of Squares	1.63438
R-Square (COD)	0.99944
Adj. R-Square	0.9992
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :

100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

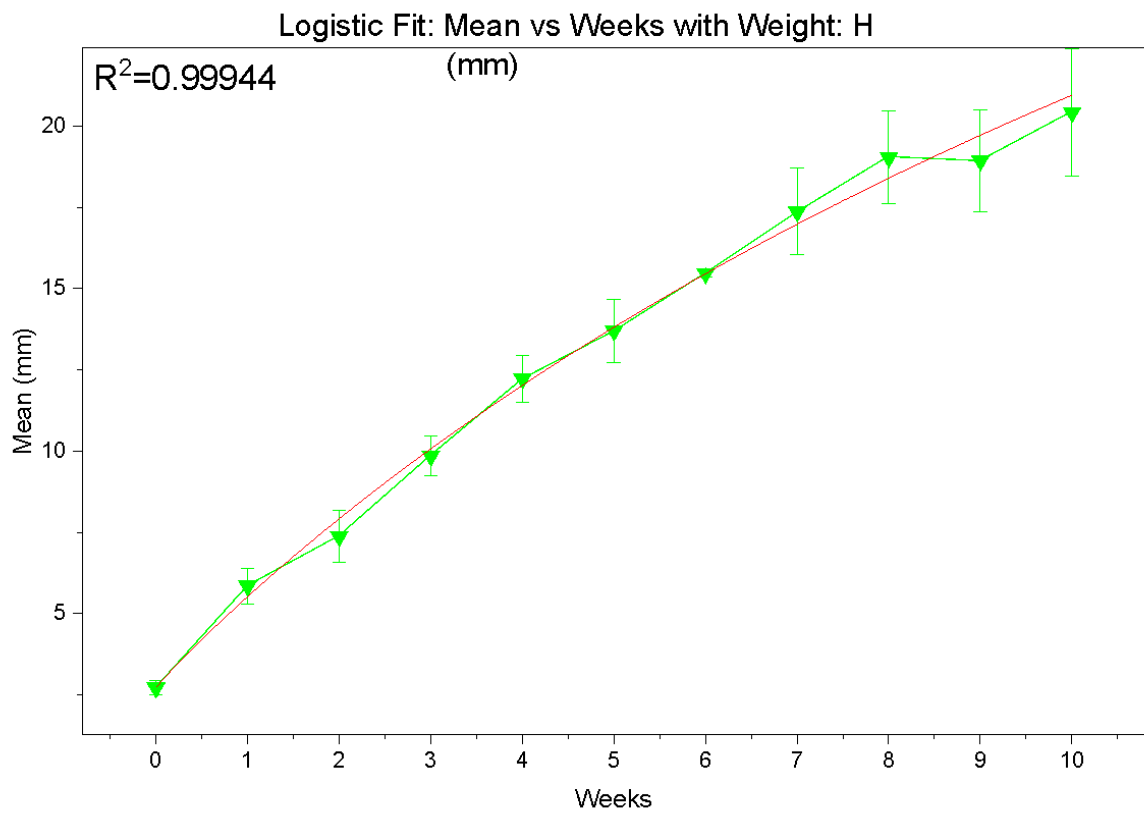
	A1	A2	x0	p	EC20	EC50	EC80	EC10	EC90	Statistics										
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square						
Mean (TR4)	2.73087	0.10543	60.53901	30.09892	22.48232	18.81288	0.95645	0.10539	5.27673	3.61315	22.48232	18.81288	95.78941	94.95133	2.26019	1.35079	223.63387	242.04205	0.23348	0.9992

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Mean (TR4)	Regression	4	19170.56671	4792.64168	20526.79771	<0.0001
	Residual	7	1.63438	0.23348		
	Uncorrected Total	11	19172.20109			
	Corrected Total	10	2921.77785			

Mean (TR4): At the 0.05 level, the fitting function is significantly better than the function $y=0$.

Fitted Curves Plot



Residual Plots

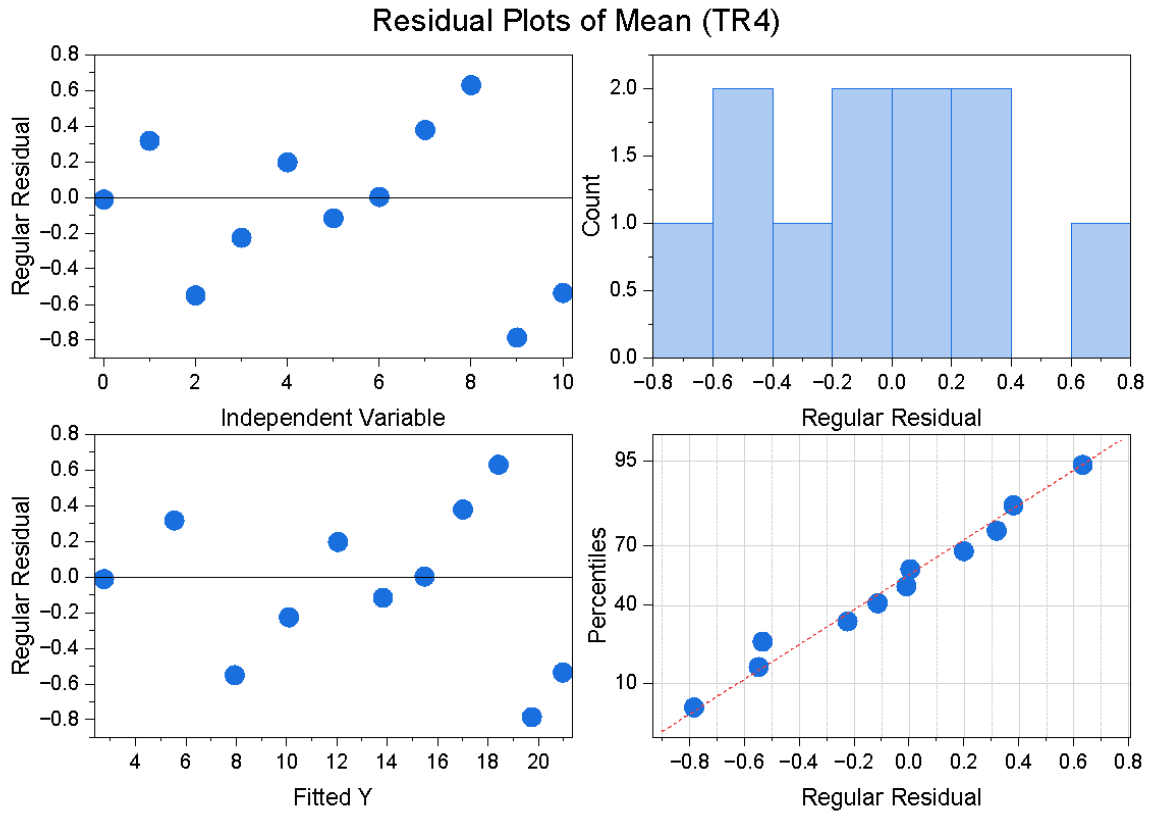


Fig.13 Nonlinear logistic curve fit for size Treatment 4 (standard laboratory diet), showing parameter estimates, goodness-of-fit statistics, ANOVA results, and residual diagnostics. The fitted logistic model includes estimates of A_1 , A_2 , X_0 , p , and the corresponding EC values (EC20, EC30, EC50, EC10, and EC80). Plots of the fitted curve and residuals are provided to illustrate model performance and the adequacy of the fit across the observed data range.

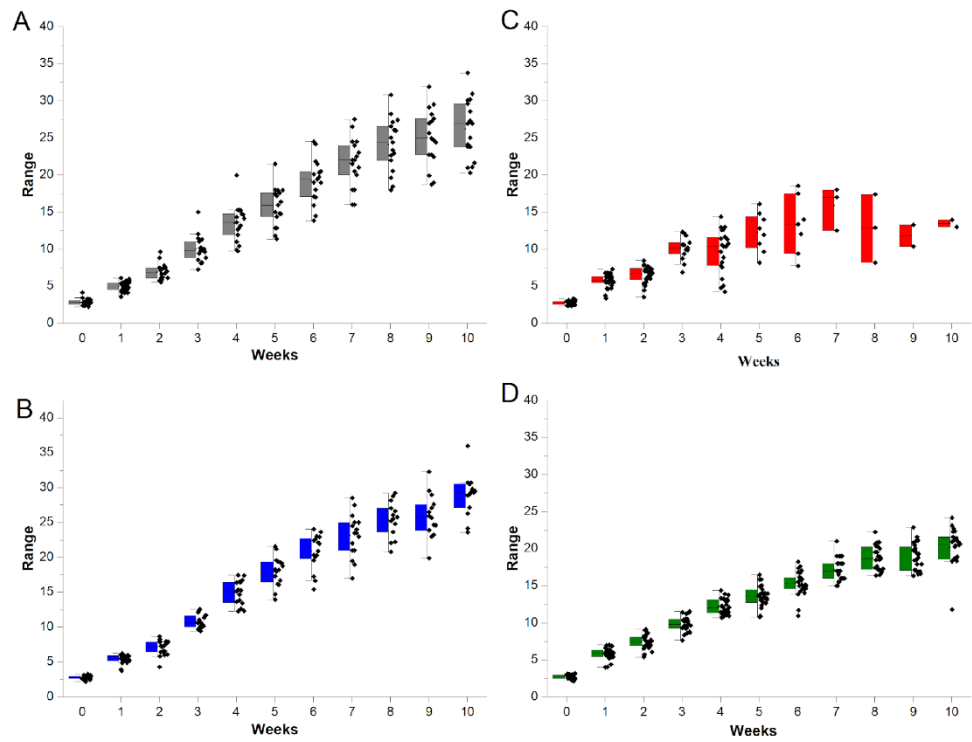


Fig. 14 Variation in the size of *P. figulina* (in grams) over 10 weeks under different feeding regimes. A. TR1: fish feed; B. TR2: *Brassica oleracea*; C. TR3: fish feed + *Brassica oleracea*; D. TR4: standard laboratory diet.

Alives

Weeks	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
0	30	30	30	30
1	29	30	26	30
2	18	30	22	27
3	17	27	19	27
4	17	23	17	27
5	17	12	17	27
6	17	9	16	25
7	17	7	16	22
8	17	5	14	22
9	17	5	14	22
10	17	5	14	22

Table 6 Weekly survival of individuals in Treatments 1, 2, 3, and 4 throughout the 10-week experimental period. The table reports the number of living individuals recorded at the beginning of the experiment (week 0) and at each subsequent week, enabling comparative assessment of survival dynamics among treatments.

Mortality % from Total				
Weeks	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
0	0	0	0	0
1	3.3%	0.0%	13.3%	0.0%
2	36.7%	0.0%	13.3%	10.0%
3	3.3%	10.0%	10.0%	0.0%
4	0.0%	13.3%	6.7%	0.0%
5	0.0%	36.7%	0.0%	0.0%
6	0.0%	10.0%	3.3%	6.7%
7	0.0%	6.7%	0.0%	10.0%
8	0.0%	6.7%	6.7%	0.0%
9	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
10	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
TOTAL	43.3%	83.3%	53.3%	26.7%

Table 7 Weekly mortality percentages of individuals in Treatments 1, 2, 3, and 4 during the 10-week experimental period. Values represent the percentage of individuals that died each week relative to the initial total (n = 30 per treatment). The final row presents the cumulative mortality percentage for each treatment across the entire experiment.

10. ANEXO – C (Material Suplementar – Artigo 3)

Quantity (g)	Ingredients	Nutritional value
60	Portion koi Vibrance	31% Crude Protein, 5% Ether Extract, 1% Calcium and 0.9% Phosphorus. At most, it has 2% Fiber, 7% Moisture and 7% Minerals, in addition to 100mg/kg of Vitamin C.
60	Ground eggshell	98% Calcium carbonate (CaCO ₃)
12	Ágar ágar	0%
120	Distilled water	0%

Tabela 1. Composição e valor nutricional da ração formulada no laboratório.

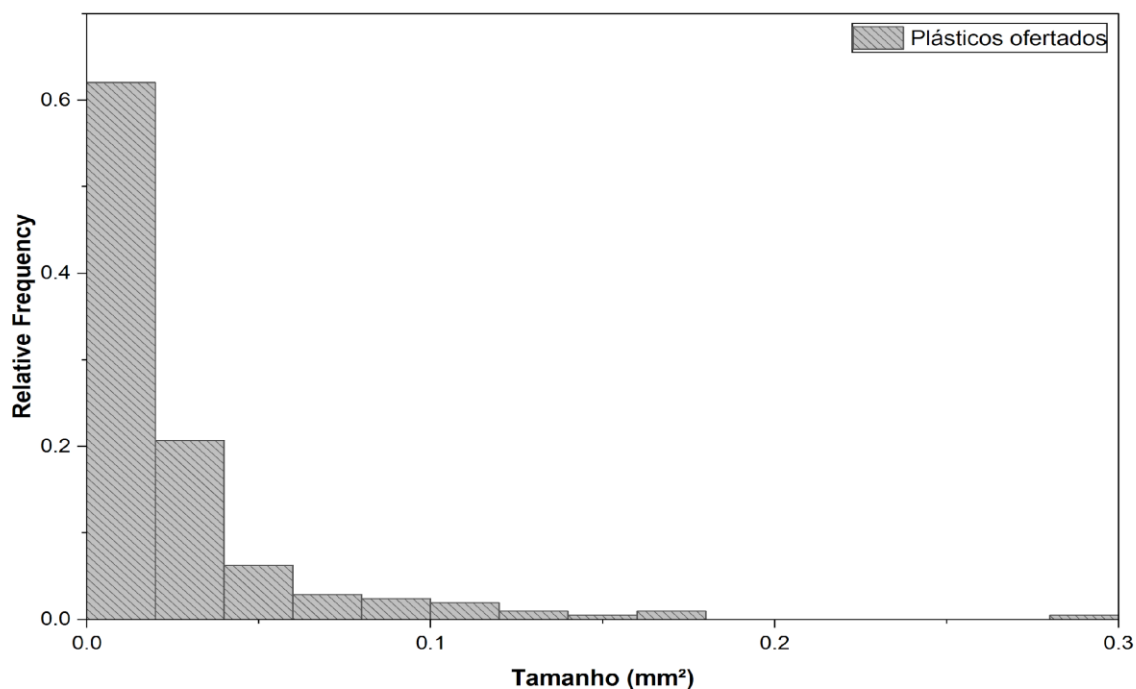


Figura 1. Histograma da distribuição do tamanho das partículas que foram ofertadas para os indivíduos de ambos os tratamentos.

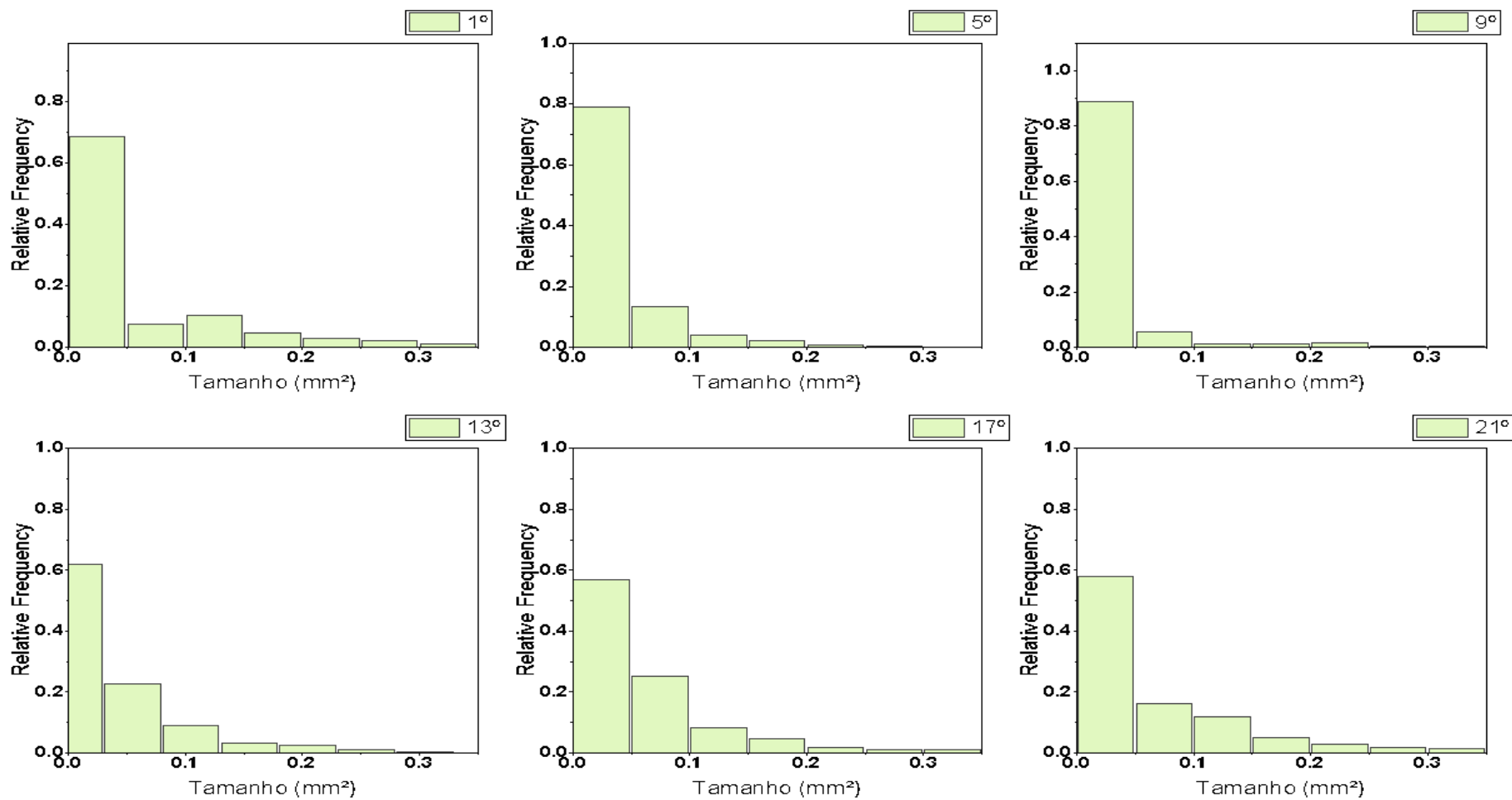


Figura 2. Histograma da distribuição do tamanho dos microplásticos de polietileno eliminadas ao longo dos dias (1° - 21°) de depuração do tratamento 1 (20% MPs).

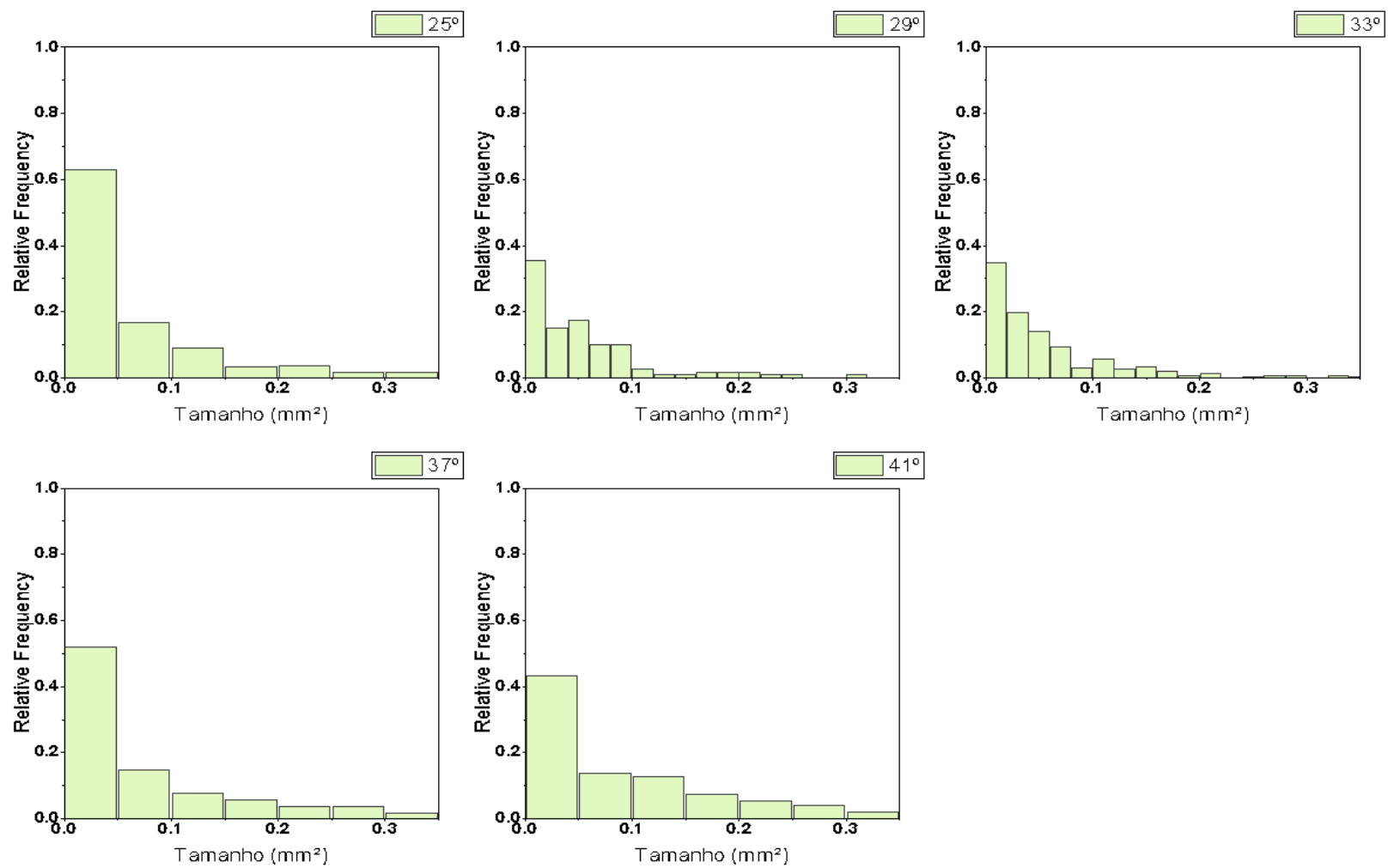


Figura 3. Histograma da distribuição do tamanho dos microplásticos de polietileno eliminadas ao longo dos dias (29° - 41°) de depuração do tratamento 1 (20% MPs).

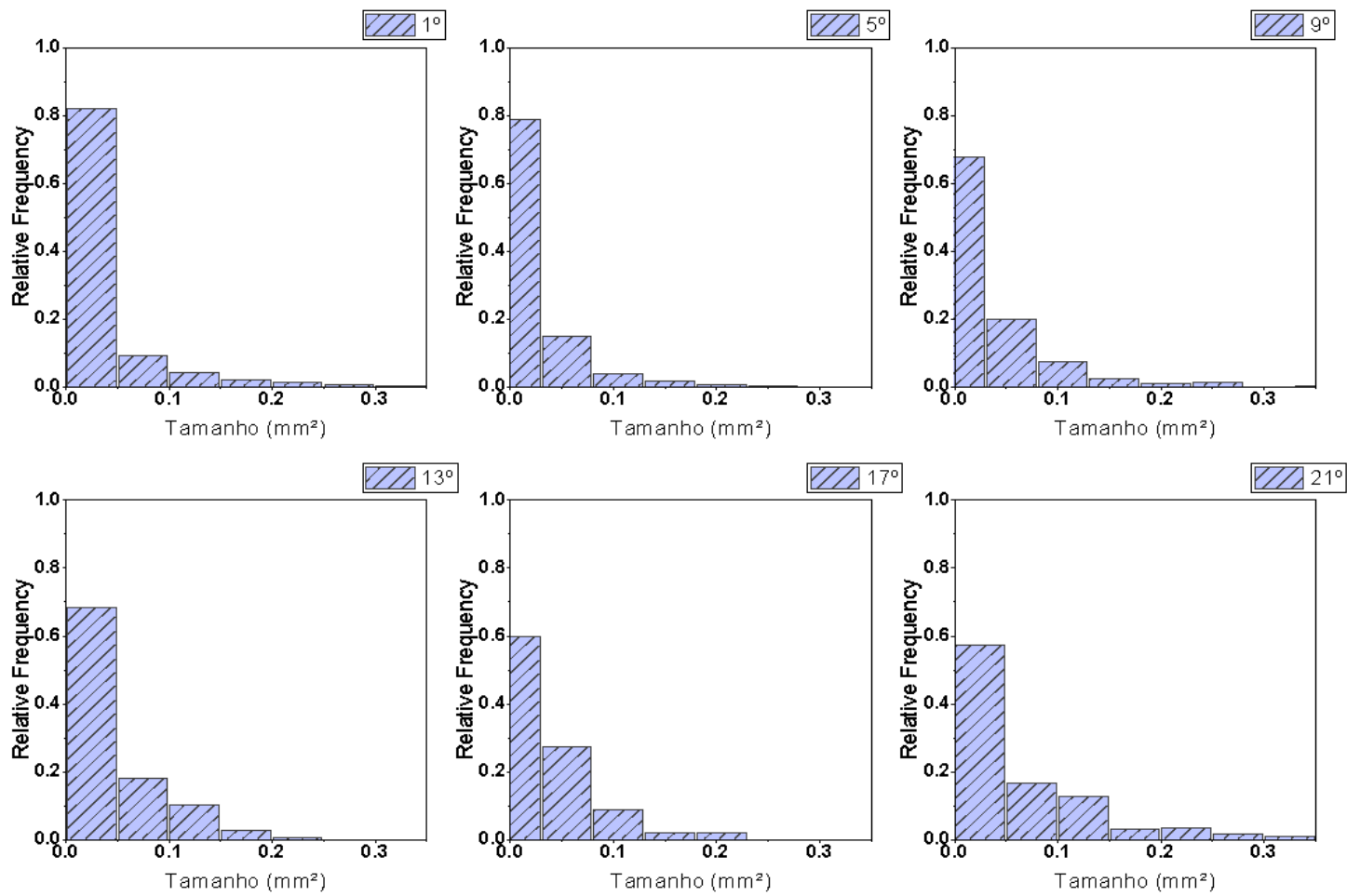


Figura 4. Histograma da distribuição do tamanho dos microplásticos de polietileno eliminadas ao longo dos dias (1°- 21°) de depuração do tratamento 2 (10% MPs)

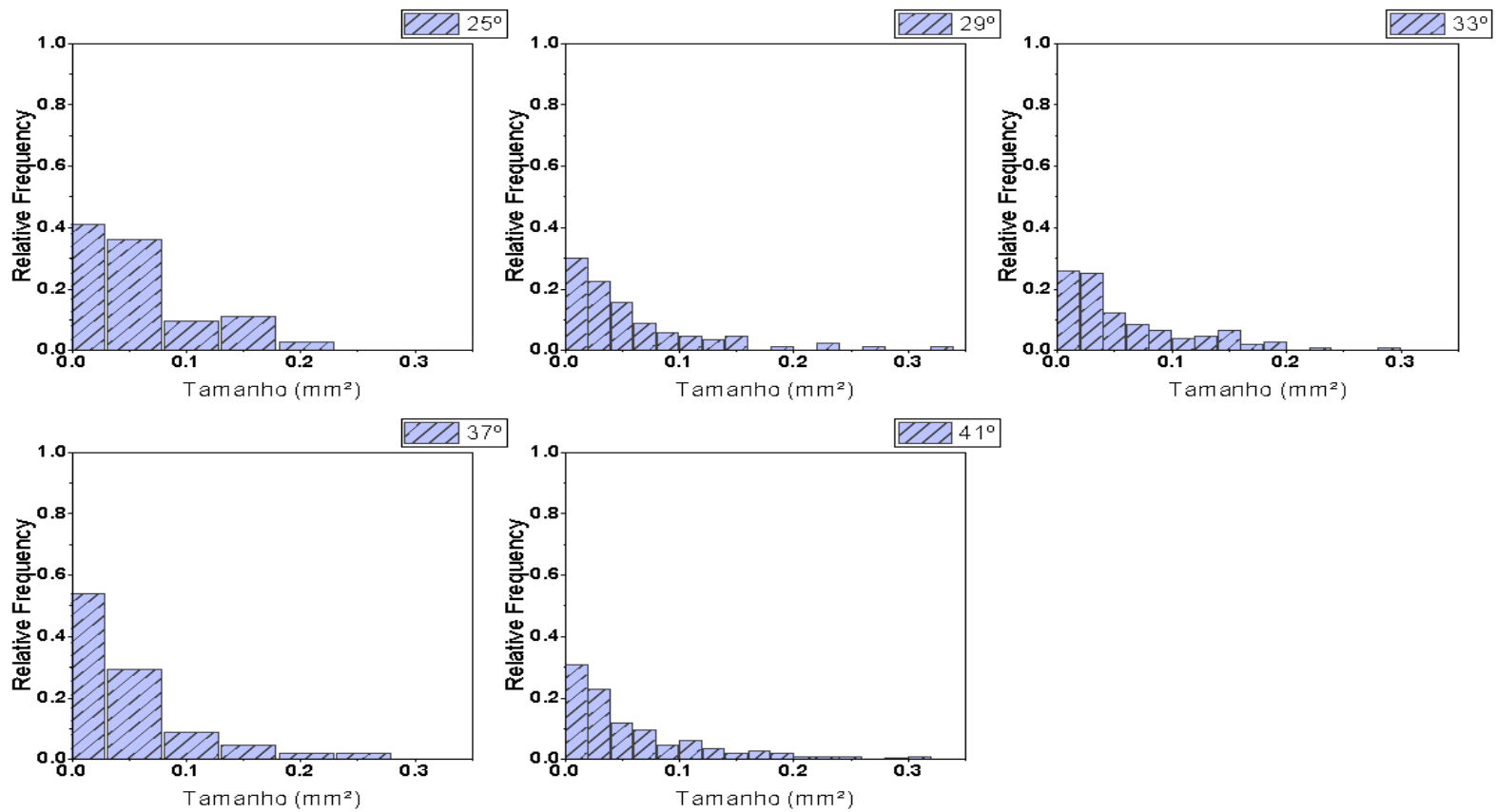


Figura 5. Histograma da distribuição do tamanho dos microplásticos de polietileno eliminadas ao longo dos dias (29° - 41°) de depuração do tratamento 2 (10% MPs)

pH and ammonia control of *P.figulina* (26/02/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	8.2	26.7	0.25	0,021
CTR 2	8.4	26.4	0.25	0,032
CTR 3	8.2	26.5	2.00	0,136
CTR 4	8.2	27.3	2.00	0,166
CTR 5	8.3	26.7	0.25	0,026
CTR 6	8.3	26.1	0.25	0,026
TR1.1	8.3	26.5	0.25	0,026
TR1.2	7.7	27.0	0.25	0,007
TR1.3	8.0	27.3	1.00	0,083
TR1.4	8.3	27.1	0.25	0,032
TR1.5	8.2	26.5	0.25	0,026
TR1.6	8.4	26.4	0.50	0,052
TR 2.1	8.0	26.4	2.00	0,009
TR 2.2	7.7	26.2	0.50	0,011
TR 2.3	8.3	26.4	0.25	0,026
TR 2.4	7.6	26.3	0.50	0,011
TR 2.5	8.4	26.4	0.25	0,026
TR 2.6	8.3	26.5	0.25	0,026

Tabela 2. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

pH and ammonia control of *P.fingulina* (28/02/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	7.7	23.9	2.00	0,036
CTR 2	8.1	22.1	1.00	0,056
CTR 3	7.8	22.7	1.00	0,036
CTR 4	7.6	22.7	1.00	0,018
CTR 5	7.8	22.3	1.00	0,036
CTR 6	7.7	21.7	0.50	0,009
TR1.1	7.8	22.6	0.50	0,018
TR1.2	7.6	22.7	1.00	0,018
TR1.3	7.8	22.7	1.00	0,036
TR1.4	7.9	22.3	0.50	0,018
TR1.5	7.9	22.7	0.25	0,009
TR1.6	8.1	21.5	0.25	0,014
TR 2.1	6.8	22.9	2.00	0,006
TR 2.2	6.5	22.6	1.00	0,002
TR 2.3	7.4	22.3	0.50	0,006
TR 2.4	6.5	22.5	2.00	0,004
TR 2.5	7.4	22.3	0.25	0,003
TR 2.6	7.2	22.0	0.50	0,004

Tabela 3. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

pH and ammonia control of *P.figulina* (04/03/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	7.3	22.7	0,25	0,002
CTR 2	7.7	22.7	0,25	0,004
CTR 3	7.5	22.6	0,25	0,004
CTR 4	7.7	22.5	0,25	0,004
CTR 5	7.6	22.3	0,25	0,004
CTR 6	7.9	22.1	1,00	0,036
TR1.1	7.5	22.7	0,50	0,009
TR1.2	7.4	22.6	0,50	0,006
TR1.3	7.3	22.5	0,50	0,004
TR1.4	7.5	22.2	0,50	0,006
TR1.5	7.9	22.0	0,50	0,018
TR1.6	7.9	22.0	0,50	0,018
TR 2.1	7.0	22.9	0,50	0,002
TR 2.2	7.1	22.9	0,50	0,002
TR 2.3	7.9	22.4	0,50	0,018
TR 2.4	6.8	22.1	2,00	0,006
TR 2.5	7.7	22.1	0,50	0,009
TR 2.6	7.5	22.0	1,00	0,011

Tabela 4. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

pH and ammonia control of *P. figulina* (12/03/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	7,4	22,8	0,25	0,003
CTR 2	7,9	22,5	0,25	0,009
CTR 3	7,8	22,4	0,25	0,009
CTR 4	8,1	22,4	0,25	0,014
CTR 5	8,1	22,1	0,25	0,014
CTR 6	8	22	0,25	0,014
TR1.1	7,8	22,7	0,25	0,009
TR1.2	7,9	22,4	0,25	0,009
TR1.3	7,7	22,4	0,25	0,004
TR1.4	7,5	22,1	0,25	0,003
TR1.5	7,9	22,1	0,50	0,009
TR1.6	8	21,9	0,25	0,014
TR 2.1	6,9	23,2	0,25	0,001
TR 2.2	6,9	22,9	0,50	0,001
TR 2.3	7,8	22,3	0,25	0,009
TR 2.4	7,5	22,3	0,25	0,003
TR 2.5	7,7	22,2	0,25	0,004
TR 2.6	7,2	22,2	0,25	0,004

Tabela 5. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

pH and ammonia control of *P.figulina* (12/03/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	7,5	23,3	0,5	0,006
CTR 2	7,7	23	1	0,018
CTR 3	7,5	23,1	1	0,011
CTR 4	7,1	23,1	1	0,005
CTR 5	7,5	22,9	1	0,011
CTR 6	7,4	22,9	0,50	0,006
TR1.1	7,5	23,2	0,25	0,003
TR1.2	7,3	23,1	0,50	0,004
TR1.3	7,4	23	0,50	0,006
TR1.4	7,5	22,9	0,50	0,006
TR1.5	7,6	22,9	0,50	0,009
TR1.6	7,6	22,9	0,25	0,004
TR 2.1	7,2	23,7	0,50	0,004
TR 2.2	7,7	23,1	0,50	0,009
TR 2.3	7,6	23,1	0,50	0,009
TR 2.4	7,2	23,1	0,25	0,004
TR 2.5	7,3	23	0,50	0,004
TR 2.6	6,7	23,1	0,50	0,001

Tabela 6. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

pH and ammonia control of *P.figulina* (21/03/2025)

Aquarium	pH	Temperature °C	Ammonia (ppm)	Ammonia (c/temp. e pH)
CTR 1	7,4	22,5	0,25	0,003
CTR 2	7,4	22,4	0,25	0,003
CTR 3	7,1	22,4	0,25	0,001
CTR 4	6,4	22,5	0,25	0,001
CTR 5	6,6	22,5	0,25	0,001
CTR 6	6,5	22,6	0,25	0,001
TR1.1	7,2	23,1	0,25	0,002
TR1.2	7,2	22,7	0,25	0,002
TR1.3	7,1	22,3	0,25	0,001
TR1.4	7,0	22,2	0,25	0,001
TR1.5	7,1	22,4	0,25	0,001
TR1.6	7,5	22,1	0,25	0,004
TR 2.1	7,1	23,5	0,25	0,001
TR 2.2	7,4	22,6	0,25	0,003
TR 2.3	7,2	22,2	0,25	0,002
TR 2.4	7,0	22,3	0,25	0,001
TR 2.5	7,3	22,3	0,25	0,002
TR 2.6	7,3	22,4	0,25	0,002

Tabela 7. Controle de pH, amônia e temperatura dos indivíduos.

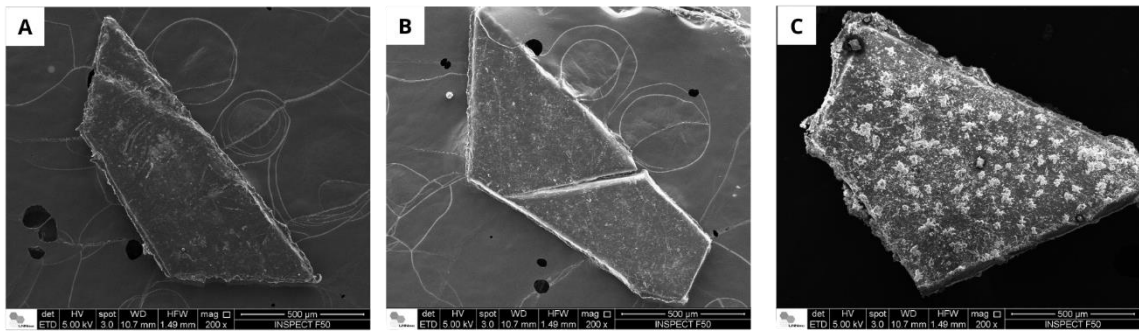


Figura 6. Imagem microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polietileno. A. Polietileno não oferecido (Controle 1). B. Polietileno após 72h na solução com peróxido de hidrogênio e armazenado na estufa por 50 °C (Controle 2), C. Polietileno encontrado no intestino da *Pomacea figulina*.

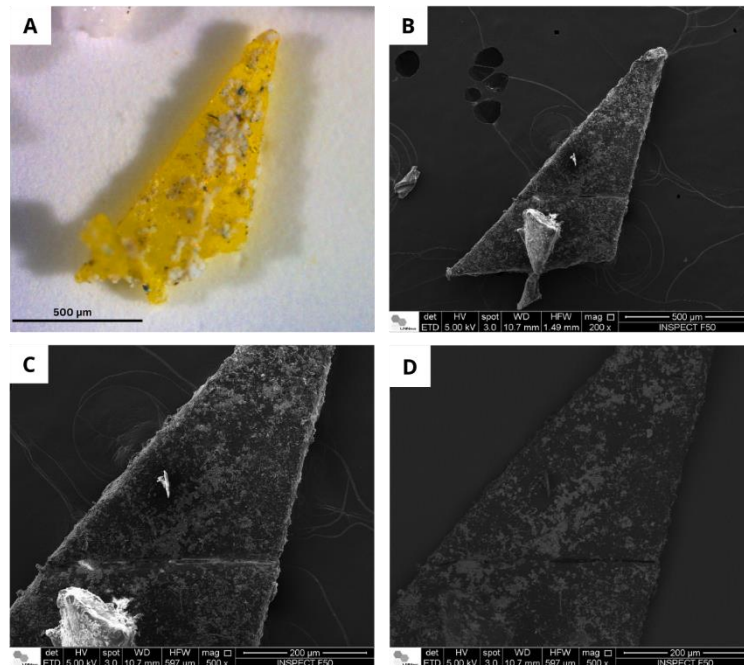


Figura 7. Imagem em microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polietileno encontrado no intestino de um indivíduo do tratamento 1. A. Imagem adquirida pelo estereomicroscópio, aumento 80x. B. Aumento de 200, C. Aumento de 500, D. Aumento de 500 com retro espalhado.

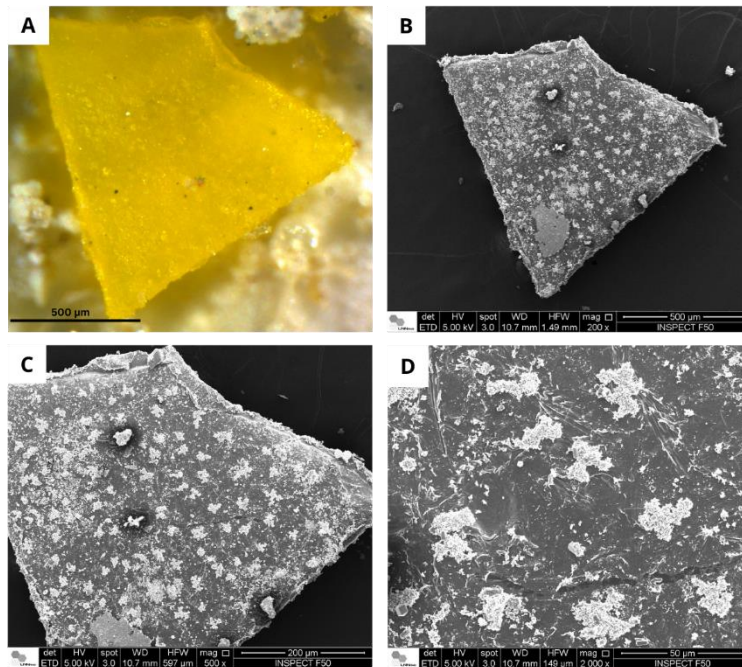


Figura 8. Imagem MEV do polietileno encontrado no intestino de um indivíduo do tratamento 1. A. Imagem adquirida pelo estereomicroscópio, aumento 80x. B. Aumento de 200x, C. Aumento de 500x, D. Aumento de 2.000x.