



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Vanessa da Silva de Castro

Morfologia e morfometria das células germinativas de ovário de
Macrobrachium potiuna (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) expostas ao
herbicida Roundup WG®

Florianópolis

2020

Vanessa da Silva de Castro

Morfologia e morfometria das células germinativas de ovário de
Macrobrachium potiuna (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) expostas ao
herbicida Roundup WG[®]

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular e do
Desenvolvimento.
Orientadora: Prof^ª Dra. Yara Maria Rauh Müller

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Castro, Vanessa

Morfologia e morfometria das células germinativas de ovário de *Macrobrachium potiana* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) expostas ao herbicida Roundup WG® / Vanessa Castro ; orientadora, Yara Maria Rauh Müller , 2020.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Crustáceo. 3. Maturação ovariana. 4. Reprodução . 5. Glifosato . I. Rauh Müller , Yara Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

VANESSA DA SILVA DE CASTRO

Morfologia e morfometria das células germinativas de ovário de *Macrobrachium Potiuna* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) expostas ao herbicida Roundup WG®

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Gabriel Adan Araujo Leite, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Juliana Dal-Ri Lindenau, Drª
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Profª. Evelise Maria Nazari, Drª.
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Profª. Yara Maria Rauh Müller, Drª.
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho, principalmente, aos meus pais João Nilson e Roseli, a minha irmã Antonella e ao meu noivo Rodrigo pelo apoio incondicional, e a todos que torceram pelo meu sucesso, mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, por ter viabilizado a realização deste trabalho, e a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação profissional.

À agência de fomento CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Yara Maria Rauh Müller pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela confiança, generosidade, paciência, presença constante e colaboração na realização deste trabalho e, principalmente, pela honra de nossas conversas sobre ciência e sobre a vida. A Sra é um exemplo de ser humano e profissional. Foi um prazer trabalhar ao seu lado!

À Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari agradeço por me receber no LRDA, pela sua paciência, pelos valiosos momentos de discussão, convivência e sugestões. Você é um exemplo de profissionalismo.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a disponibilidade na avaliação deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, pelo companheirismo, pelas conversas científicas, pelos momentos agradáveis de convivência e pelos momentos de aprendizagens na bancada. Em especial, aos colegas Giulia, Laíse, Maico e Nathália por toda a jornada que compartilhamos desde o início do mestrado. Ao Madson, agradeço, por compartilhar de seu amor pelos crustáceos, pelo companheirismo durante as coletas, pelo incentivo, pelos momentos de discussão, pelas orientações, por toda contribuição para a realização desta pesquisa.

À equipe do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), agradeço a todo auxílio e atenção durante a realização das análises laboratoriais.

Agradeço aos meus pais João e Rose, a minha irmã Antonella, que apesar da distância físicas sempre estiveram presentes através das palavras de conforto, carinho, incentivo, conselhos e por acreditar e confiar na minha capacidade em todos os momentos, vocês são meu suporte de amor e lealdade. Meu noivo Rodrigo, obrigado pelo seu incentivo, dedicação, cuidado e carinho, serei sempre grata! Ao meu amor de quatro patas Lilica, agradeço pela sua companhia constante e por seu abraço carinhoso e reconfortante.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Os herbicidas a base de glifosato (HBG), empregados nas lavouras para o controle do crescimento de plantas indesejáveis, podem atingir os ecossistemas aquáticos e comprometer os organismos não alvos, como peixes e invertebrados. Estudos focando a toxicidade de HBG em crustáceos, principalmente caranguejos, têm demonstrado que o sistema reprodutor feminino é alvo da toxicidade do herbicida, interferindo na maturação ovariana, e consequentemente na reprodução. Assim, *Macrobrachium potiuna*, um camarão de água doce endêmico da fauna brasileira, de ampla distribuição geográfica e que desempenha um papel importante na cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos tropicais, tem demonstrado ser um adequado organismo para estudos relacionados a toxicidade reprodutiva. Considerando que (i) HBG são os mais utilizados no mundo e que lideram o *ranking* de ingredientes ativos mais comercializados no Brasil; (ii) as espécies apresentam sensibilidade diferenciada a um mesmo agente tóxico; (iii) são escassos os estudos avaliando o potencial toxicológico de HBG em representantes endêmicos da carcinofauna brasileira e que (iv) os ovários de crustáceos decápodes, quando expostos a HBG, apresentam um comprometimento no ciclo reprodutivo e consequentemente na maturação ovariana pretende-se investigar os efeitos deste composto na morfologia, morfometria e sobre os conteúdos de carboidratos e proteínas presentes nas células germinativas de *M. potiuna*. As fêmeas foram coletadas na Cachoeira do Poção em Florianópolis/SC, transportadas ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA/BEG/UFSC) e aclimatadas por 7 dias. As fêmeas foram expostas por 14 dias às concentrações de 0,065 e 0,28 mg/L de Roundup WG[®] e um grupo 0,00 mg/L constituindo o grupo controle. A caracterização macroscópica dos estágios da maturação ovariana, análises da biometria corporal e ovariana e a obtenção do índice gonadossomático (IGS) foram realizados. Para as análises da morfologia do ovário e das células germinativas, os ovários foram fixados em Bouin, incluídos em parafina, seccionados a 6 µm, sendo as seções coradas em HE. Para a quantificação dos polissacarídeos ácidos, neutros e de proteínas totais, realizou-se as técnicas de Azul de Toluidina, Ácido Periódico de Schiff e Azul Brilhante de Comassie, e a quantificação da proteína vitelina foi realizada por imuno-histoquímica. A partir das análises macroscópicas, foi possível identificar três estágios da maturação ovariana de *M. potiuna* (inicial, intermediário e avançado), e através das análises microscópicas, foram categorizadas as células germinativas em ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos I, ovócitos pré-vitelogênicos II, ovócitos vitelogênicos e ovócitos maduros. A exposição de fêmeas de *M. potiuna* ao herbicida Roundup WG[®] aumentou o comprimento do maior e menor eixo dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos das classes I e II, enquanto que reduziu o maior e menor eixo dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos da classe III, além de alterar o maior eixo dos núcleos dos ovócitos pré-vitelogênicos e dos ovócitos vitelogênicos. O herbicida também aumentou o conteúdo dos carboidratos e proteínas dos ovócitos pré-vitelogênicos, vitelogênicos e maduros. Mesmo em concentrações ambientalmente relevantes para rios do Brasil, efeitos adversos do HBG foram identificados sobre os ovócitos de *M. potiuna*, o que pode representar um importante risco para a reprodução destes crustáceos e, consequentemente, para a manutenção da espécie.

Palavras-chave: Crustáceos, maturação ovariana, morfometria dos ovócitos, reprodução, glifosato.

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides (GBH), used in crops to control the growth of undesirable plants, can reach aquatic ecosystems and compromise non-target organisms, such as fish and invertebrates. Studies focusing GBH toxicity in crustaceans, especially crabs, have shown that the female reproductive system can be a target of the herbicide toxicity, interfering in ovarian maturation, and consequently in reproduction. Thus, *Macrobrachium potiuna*, a freshwater prawn endemic to Brazilian fauna, with wide geographical distribution and an important role in the food chain of tropical aquatic ecosystems, has been shown to be an adequate organism for studies related to reproductive toxicity. Considering that (i) GBH are the most used herbicide in the world and that lead the ranking of the most commercialized active ingredients in Brazil; (ii) the species have different sensitivity to the same toxic agent; (iii) there are studies evaluating the toxicological potential of GBH in endemic representatives of Brazilian crustacean fauna and that (iv) the ovaries of decapod crustaceans, when exposed to GBH, present a compromise in the reproductive cycle and, consequently, in ovarian maturation, the aim of this study is to investigate the effects of this compound on morphology, morphometry and on the content of carbohydrates and proteins in the germ cells of *M. potiuna*. Females were collected at Cachoeira do Poção, Florianópolis/SC, transported to the Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA/BEG/UFSC) and acclimated for 7 days. The females were exposed for 14 days to concentrations of 0.065 and 0.28 mg/L of Roundup WG[®] and a 0.00 mg/L group constituting the control group. The macroscopic characterization of the ovarian maturation stage, analysis of body and ovarian biometrics and gonadosomatic index (GSI) were performed. For the analysis of ovarian and germ cells morphology, the ovaries were fixed in Boiun, included in paraffin, sectioned at 6 µm and stained in Hematoxylin and eosin. For the quantification of acid and neutral polysaccharides and total protein, the Toluidine blue, Periodic acid-reactive Schiff and Coomassie Brilliant Blue techniques were performed, and the quantification of the vitelline protein was performed by immunohistochemistry. From macroscopic analyzes, it was possible to identify three stages of the ovarian maturation of *M. potiuna* (initial, intermediate and advanced), and through microscopic analyzes, germ cells were categorized into oogonia, pre-vitellogenic oocytes I, pre-vitellogenic oocytes II, vitellogenic oocytes and mature oocytes. The exposure of *M. potiuna* females to the herbicide Roundup WG[®] increased the length of the major and minor pre-vitellogenic and vitellogenic oocytes of classes I and II, while reducing the major and minor axis of the pre-vitellogenic and vitellogenic oocytes of the class III, in addition to altering the major axis of the pre-vitellogenic oocytes and vitellogenic oocytes. The herbicide also increased the content of carbohydrates and proteins in pre-vitellogenic oocytes. The herbicide also increased the content of carbohydrates and proteins in pre-vitellogenic, vitellogenic and mature oocytes. Even at concentrations that are environmentally relevant to rivers in Brazil, adverse effects of GBH have been identified on oocytes of *M. potiuna*, which may represent an important risk for the reproduction of these crustaceans and, consequently, for the maintenance of the species.

Keywords: Crustaceans; ovarian maturation, oocytes morphometry, reproduction, glyphosate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Posição do ovário maduro no cefalotórax de representantes do gênero <i>Macrobrachium</i> em relação aos demais órgãos.....	21
Figura 2: Representação do local de coleta de <i>M. potiuna</i>	24
Figura 3: Representação da posição do ovário em relação ao estômago e hepatopâncreas de <i>M. potiuna</i> durante o processo de maturação.....	25
Figura 4: Representação das análises morfométricas realizadas a partir de secções coradas em HE.....	28
Figura 5: Programa <i>Image J</i> versão 1.51k, análise da Densidade Integrada.....	29
Figura 6: Comprimento total das fêmeas de <i>M. potiuna</i> , após a exposição ao RWG [®] por 14 dias.....	30
Figura 7: Massa corporal e ovariana de fêmeas de <i>M. potiuna</i> expostas ao RWG [®] durante 14 dias.....	31
Figura 8: Distribuição das fêmeas de <i>M. potiuna</i> em classes, de acordo com o IGS.....	31
Figura 9: Morfologia externa do ovário de <i>M. potiuna</i> , não exposta ao RWG [®]	33
Figura 10: Representação das células germinativas do ovário de <i>M. potiuna</i>	34
Figura 11: Corte transversal do ovário de <i>M. potiuna</i> não expostas ao RWG [®]	34
Figura 12: Morfologia dos OPV-I de ovários de <i>M. potiuna</i> não expostos ao RWG [®]	35
Figura 13: Morfologia dos OPV-II de ovários de <i>M. potiuna</i> não expostos ao RWG [®]	36
Figura 14: Morfologia dos OV-I e II de ovários de <i>M. potiuna</i> não expostos ao RWG [®]	37
Figura 15: Morfologia dos OM de ovários de <i>M. potiuna</i> não expostos ao RWG [®]	37
Figura 16: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos OPV-I de ovários de <i>M. potiuna</i> das classes I, II e III, após a exposição por 14 dias.....	39
Figura 17: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos OPV-II de ovários de <i>M. potiuna</i> das classes I, II e III, após exposição por 14 dias.....	39
Figura 18: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos OV-I de ovários de <i>M. potiuna</i> das classes I, II e III e de OvV-II de ovários da Classe I, após 14 dias de exposição.....	40
Figura 19: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos OV dos ovários das classes I, II e III de <i>M. potiuna</i> , após 14 dias de exposição.....	41
Figura 20: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos OM de ovários de <i>M. potiuna</i> da Classes III, após 14 dias de exposição.....	41

Figura 21: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do menor eixo dos OPV-I e II de ovários de <i>M. potiuna</i> da Classes I, II e III, após 14 dias de exposição.....	42
Figura 22: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do menor eixo dos OV de ovários de <i>M. potiuna</i> da Classes I, II e III, após 14 dias de exposição.	43
Figura 23: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do menor eixo dos OM de ovários de <i>M. potiuna</i> da Classes III, após 14 dias de exposição.	44
Figura 24: Densidade integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OPV de ovários de <i>M. potiuna</i> após 14 dias de exposição ao RWG [®]	46
Figura 25: Efeito do RWG [®] no conteúdo de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas totais dos OPV, após exposição por 14 dias.	46
Figura 26: Densidade Integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OV de ovários de <i>M. potiuna</i> após 14 dias de exposição ao RWG [®]	47
Figura 27: Efeito do RWG [®] sobre o conteúdo de polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OV de ovários de <i>M. potiuna</i> , após 14 dias de exposição.	48
Figura 28: Densidade Integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OM de ovários de <i>M. potiuna</i> após 14 dias de exposição ao RWG [®]	48
Figura 29: Efeito do RWG [®] sobre o conteúdo de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas totais dos OM de ovários de <i>M. potiuna</i> , após exposição por 14 dias.	49
Figura 30: Imunomarcção da proteína vitelina nas células germinativas do ovário de fêmeas de <i>M. potiuna</i> não expostas ao RWG [®]	50
Figura 31: Densidade Integrada das reações positivas para a proteínas vitelina em OPV de ovários de <i>M. potiuna</i> após 14 dias de exposição ao RWG [®]	51
Figura 32: Densidade Integrada das reações positivas para a proteína vitelina em OV de ovários de <i>M. potiuna</i> , após 14 dias de exposição ao RWG [®]	51
Figura 33: Efeito do RWG [®] sobre a proteína vitelina dos OPV e OV de ovários de <i>M. potiuna</i> , após exposição por 14 dias	52
Figura 34: Resumo gráfico dos efeitos da exposição de fêmeas de <i>M. potiuna</i> , durante a maturação ovariana, ao RWG [®]	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice gonadosomático dos ovários de <i>M. potiuna</i> , por classe, após a exposição ao RWG [®] por 14 dias.	32
Tabela 2: Número de OPV-I e II, OV-I e II e OM, mensurados quanto ao comprimento do menor e maior eixo/concentração/classe de IGS.	38
Tabela 3: Efeito do RWG [®] sobre o comprimento do maior eixo dos núcleos das células germinativas de ovários de <i>M. potiuna</i> das Classes I, II e III, após 14 dias de exposição. .	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATO – azul de toluidina

BSA – albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*

CCB – azul brilhante de Comassie, do inglês *colloidal Coomassie blue*

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CT – comprimento total

DAB – 3-3, diaminobenzidina

EAV – estágio avançado

EEC- Comunidade Econômica Europeia

EI – estágio inicial

EIn – estágio intermediário

EPM – erro padrão da média

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*

HBG – herbicida a base de glifosato

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGS – índice gonadossomático

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

MMA – Ministério do Meio Ambiente

Og - ovogônias

OM – ovócito maduro

OPV – ovócito pré-vitelogênico

OV – ovócito vitelogênico

PAS – ácido periódico de Schiff, do inglês *periodic acid-reactive Schiff*

PBS – tampão fosfato salino, do inglês, *phosphate buffered saline*

POEA – polioxietilenamida

RWG® – Roundup WG®

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Vegetal.

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	AGROTÓXICOS E O POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO HERBICIDA GLIFOSATO	15
1.2	AÇÃO DE HBG SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVOS	18
1.3	OVÁRIO COMO ORGÃO-ALVO DE HERBICIDAS	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DAS FÊMEAS DE <i>MACROBRACHIUM POTIUNA</i>	24
3.2	EXPOSIÇÃO DAS FÊMEAS DE <i>MACROBRACHIUM POTIUNA</i> AO ROUNDUP WG®	25
3.3	BIOMETRIA CORPORAL E OVARIANA	26
3.4	ANÁLISES MICROSCÓPICAS	26
3.5	ANÁLISES DOS RESULTADOS	28
4	RESULTADOS	29
4.1	EFEITO DO RWG® SOBRE O ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)	30
4.2	EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO ROUNDUP WG® SOBRE A MORFOLOGIA DOS OVÁRIOS DE <i>MACROBRACHIUM POTIUNA</i>	32
4.3	EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO ROUNDUP WG® SOBRE A MORFOMETRIA DOS OVÓCITOS DO OVÁRIO DE <i>MACROBRACHIUM POTIUNA</i>	38
4.3.1	Efeito do Roundup WG® sobre o comprimento do maior eixo das células germinativas do ovário de <i>Macrobrachium potiuna</i>	38
4.3.2	Efeito do Roundup WG® sobre o comprimento do menor eixo das células germinativas de ovários de <i>Macrobrachium potiuna</i>	42

4.3.3	Efeito do RWG [®] sobre a morfometria do núcleo das células germinativas do ovário de <i>Macrobrachium potiuna</i>	44
4.4	EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO RWG [®] SOBRE OS CONTEÚDOS DE PROTEÍNAS TOTAIS, POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS E NEUTROS E PROTEÍNA VITELINA NOS OVÁRIOS DE <i>MACROBRACHIUM POTIUNA</i>	45
5	DISCUSSÃO	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A atividade agrícola tem uma importante participação na economia brasileira, fato que tem contribuído para o crescimento do setor de agronegócio no país (FAO-*Food and Agriculture Organization* 2012, 2017). Entretanto, o incremento da produção agrícola com a ampliação das áreas de cultivo, está intimamente associada ao uso extensivo de agrotóxicos, devido a sua capacidade de aumentar a produtividade, reduzir a perda de colheitas e melhorar a qualidade dos produtos (Coutinho et al., 2005; Rigotto et al., 2014).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas à base de glifosato (HBG) estão entre os produtos agrícolas mais comercializados no mundo. Este ingrediente ativo já foi encontrado em ambientes aquáticos e sua presença pode causar prejuízos em diferentes organismos não-alvos, como anfíbios (Navarro-Martín et al., 2014); peixes (Armiliato et al., 2014; Maskey et al., 2019); moluscos (Akcha et al., 2012; Mottier et al., 2015) e crustáceos (Canosa et al., 2018; Melo et al., 2019a,b; Canosa et al., 2019).

Em crustáceos, estudos de toxicidade do HBG avaliam os efeitos ocasionados por este herbicida em tecidos, como o muscular (Frontera et al., 2011) e em órgãos, como as brânquias (Matozzo et al., 2018), hepatopâncreas (Frontera et al., 2011, Melo et al., 2019a,b) e em gônadas (Canosa et al., 2019). Os ovários são importantes alvos do HBG e em crustáceos decápodes a maturação ovariana pode ser comprometida pela exposição ao herbicida, como demonstrado nos estudos realizados por Avigliano et al., (2018) e Canosa et al., (2018) no caranguejo *Neholice granulata*.

Neste sentido, a realização de análises morfológicas e morfométricas, são ferramentas metodológicas que podem fornecer informações relevantes sobre os efeitos do HBG na organização estrutural e no processo de maturação dos ovários de *M. potiuna*. Assim, considerando a importância da integridade deste órgão para a manutenção da espécie, o presente estudo representa a primeira tentativa de avaliar a toxicidade reprodutiva de um herbicida amplamente utilizado, como o HBG, no ovário de *M. potiuna*, uma espécie de crustáceo ecologicamente importante dos ecossistemas brasileiros de água doce.

1.1 AGROTÓXICOS E O POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO HERBICIDA GLIFOSATO

A legislação brasileira, Lei Nº 7.802/1989, define que agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção,

armazenamento e beneficiamento, cuja finalidade é alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Brasil, 1989).

Entre os anos de 1975 a 2009, o Brasil foi o sexto maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Rebelo et al., 2010), sendo que seu consumo, em 2008, chegou a 496.000 toneladas de ingredientes ativos, havendo cerca de 1.670 formulações disponíveis no mercado (ANVISA, 2015; Barbosa et al., 2015). Dentre os agrotóxicos mais aplicados em áreas agrícolas no país, encontram-se os fungicidas (14%), os inseticidas (23%) e os herbicidas (60%) (SINDIVEG, 2015).

Os herbicidas são responsáveis por melhorar o rendimento das culturas através da prevenção e controle do crescimento de ervas daninhas (Lasram et al., 2014). A publicação “Indicadores do Desenvolvimento Sustentável” relata que na classe dos herbicidas mais utilizados no território brasileiro, entre os anos de 2009 a 2012, cerca de 62% continham em sua formulação o ingrediente ativo glifosato (IBGE, 2015). Em 2017, foram comercializadas 173.150 toneladas de glifosato, o que tornou o Brasil, o primeiro no *ranking* mundial de consumo deste composto (IBGE, 2015; IBAMA, 2017; ANVISA 2019).

A molécula de glifosato foi sintetizada pela primeira vez em 1950, por Henri Martin, (Benbrook, 2016) e em 1970, John Franz (Companhia Monsanto), confirmou sua atividade herbicida, sendo que em 1974 a empresa lançou no mercado a primeira formulação comercial à base de glifosato, denominada de Roundup® (Duke & Powles, 2008). No Brasil, a sua comercialização iniciou em 1978 e, em 1984, o herbicida começou a ser produzido no país (Galli & Montezuma, 2005).

O herbicida glifosato é um organofosforado, cuja formulação comercial é N-(fosfonometil)-glicina], sendo a fórmula molecular $C_3H_6NO_5P$. O glifosato é classificado como um herbicida de amplo espectro, sistêmico, pois após absorvido pela superfície das folhas e raízes, é translocado através do floema para as outras partes da planta (Duke & Powles, 2008). Também é considerado não seletivo, devido a sua capacidade de interferir no crescimento de plantas não-alvos expostas a esse composto (Williams, 2000) e pós-emergente, ou seja, é aplicado após o crescimento das plantas daninhas e antes que essas interfiram no cultivo agrícola.

A principal função do herbicida glifosato é controlar o crescimento de plantas indesejáveis em áreas agrícolas, urbanas e de lazer, por meio da inibição da síntese da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) presente em plantas, fungos e bactérias, mas ausente em animais (Annett et al., 2014). Esta via, é responsável pela biossíntese de corismato,

um intermediário na síntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), responsáveis pela defesa das plantas aos organismos patogênicos (Mensah et al., 2014; Komives & Schröder, 2016).

Para aumentar a eficácia do glifosato nas plantas, ele é formulado com compostos chamados de “ingredientes inertes”, sendo que o mais conhecido deles é o surfactante Polioxietilenamida (POEA) (Annett et al., 2014). Estudo realizado com a molécula pura de glifosato, sal de isopropilamina de glifosato, surfactante POEA e de formulação a base de glifosato (Folmar et al., 1979) concluiu que o surfactante é um ingrediente chave na toxicidade de herbicidas a base de glifosato. Outros estudos têm sido realizados para elucidar a toxicidade do glifosato e de suas formulações (Moreno et al., 2014; Janssens & Stoks 2017, Bednářová et al., 2020). O glifosato é utilizado em mais de 750 formulações diferentes, produzidas por aproximadamente 91 fabricantes em 20 países (Guyton et al., 2015) e a concentração do princípio ativo glifosato, bem como a natureza dos princípios inertes, dependem da formulação comercial, sendo que as formulações Roundup estão entre as mais utilizadas.

No Brasil, HBG são utilizados, principalmente na cultura de milho, soja, café, cana-de-açúcar, algodão e frutas, entre outros (Amarante Junior et al. 2002, Rebelo et al., 2010), além do uso em gramados, vias públicas e jardins (Hank et al., 2010). A aplicação do HBG se dá geralmente por pulverização, sendo que parte do herbicida pulverizado chega ao solo, onde apresenta rápida e alta taxa de adsorção pelos sedimentos e partículas. Dependendo da composição do solo, o tempo de degradação do glifosato pode variar (Giesy et al., 2000). Em solos arenosos, sua meia vida é de 19 dias (Prata et al., 2005), enquanto que em uma floresta localizada no Canadá, sua meia vida é de 45 a 60 dias (Feng e Thompson, 1990) e em áreas agrícolas dos EUA e França sua meia vida é de 141 e 197 dias (Giesy et al., 2000).

O HBG adsorvido pelo solo pode ser transportado para os ambientes aquáticos, por meio da lixiviação e erosão (Amarante Júnior et al., 2002). Além destas vias, a contaminação dos ecossistemas por este produto, também pode ocorrer por meio da pulverização aérea, deriva pelo vento, aplicação em plantas daninhas aquáticas e margens de corpos d'água. Contudo, as chuvas são as principais responsáveis pelo transporte do herbicida das áreas agrícolas até rios e lagos, localizados no entorno das plantações (Annett et al., 2014). Uma vez na água, o HBG apresenta meia-vida de 7 a 21 dias, podendo ficar aderido à matéria orgânica em suspensão, depositando-se no sedimento e comprometendo organismos não alvos que ali habitam, como peixes e invertebrados aquáticos (Giesy et al., 2000; Amarante Junior et al., 2002; Mensah et al., 2012).

O uso extensivo e desordenado de HBG traz potenciais riscos a qualidade do solo e das águas superficiais e subterrâneas. No Brasil, é de responsabilidade do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), estabelecer normas referentes ao controle e a manutenção da qualidade do meio ambiente. A resolução Nº 357/CONAMA/2005 regulamenta que os corpos de água doce são classificados em classes, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes. A classe I é destinada ao abastecimento para consumo humano, à proteção das comunidades aquáticas, atividades de recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e difere da Classe II, apenas por esta ser utilizada na aquicultura e atividade de pesca. Nestas classes o limite máximo de glifosato permitido é de 0,065 mg/L, enquanto que para águas da classe III, destinada para consumo humano após tratamento convencional ou avançado, irrigação de culturas arbóreas, pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais, o valor máximo de glifosato permitido é de 0,28 mg/L (Brasil, 2005).

Além do Brasil, a Comunidade Econômica Europeia (EEC) estabelece a concentração de 0,0001 mg/L para qualquer composto considerado tóxico, em águas destinadas ao consumo humano, enquanto que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabelece o nível máximo de 0,7 mg/L para água potável (Mallat & Barceló, 1998; US EPA, 2016).

A exposição dos ecossistemas aquáticos ao HBG, pode desencadear um comprometimento da qualidade ambiental e interferir no seu funcionamento, reduzindo a diversidade de espécies sensíveis a ele, alterando as cadeias alimentares, o fluxo de energia, a ciclagem de nutrientes e, conseqüentemente, sua estabilidade e resistência (Pérez et al. 2011). Neste sentido, estudos voltados para o reconhecimento dos efeitos de HBG são fundamentais para avaliação do uso destes herbicidas em diferentes organismos alvos, uma vez que as espécies apresentam sensibilidade diferenciada a um mesmo poluente.

1.2 AÇÃO DE HBG SOBRE ORGANISMOS NÃO-ALVOS

O crescente uso de HBG em atividades agrícolas e sua presença em corpos de água (Freire et al., 2012), têm demonstrado a relevância de realizar pesquisas acerca da toxicidade deste herbicida em organismos aquáticos, os quais tem demonstrado respostas que vão desde o nível molecular até sistêmico. A exposição ao HBG causou efeitos no desenvolvimento, crescimento e na proporção sexual na rã-de-floresta *Lithobates sylvaticus* (Navarro-Martín et al., 2014),

alterações nas brânquias, no fígado e rim do peixe *Oreochromis niloticus* (Jiraungkoorskul et al., 2003) e reduziu a fertilidade em fêmeas do peixe *Rhamdia quelen* (Soso et al., 2007). Estudos realizados no Brasil demonstraram que o HBG causou genotoxicidade e danos histológicos no cérebro, fígado, rim e brânquias do peixe *Geophagus brasiliensis* (Oliveira et al., 2019) e reduziu o potencial de fertilização dos espermatozoides do peixe-rei *Odontesthes humensis* (Silveira et al., 2019).

Na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), são realizados estudos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) do Centro de Ciências Biológicas (CBB) acerca da toxicidade de HBG em organismos aquáticos, caracterizando seus efeitos nas células, tecidos e órgãos do sistema respiratório, nervoso e reprodutor. Em *Danio rerio*, o HBG induziu alterações na cadeia respiratória mitocondrial e no comportamento, além de aumentar o diâmetro de ovócitos e reduzir o índice gonadossomático (IGS) (Armiliato et al., 2014; Jaramillo et al., 2018; Pereira et al., 2018).

Estudos demonstraram que o HBG é capaz de causar efeitos também em invertebrados aquáticos (Mensah et al., 2014), interferindo em parâmetros comportamentais, fisiológicos e reprodutivos da planária *Girardia tigrina* (López et al., 2019); na maturação ovariana, estimulando a desova precoce em ostras *Crassostrea gigas* (Mottier et al., 2015); nas respostas bioquímicas envolvidas no processo de desintoxicação do mexilhão *Limnoperna fortunei* (Lummato et al., 2018) e na regulação transcricional de genes, no transporte transmembrana e no metabolismo energético do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (Milam et al., 2018).

Em crustáceos, formulações de HBG foram responsáveis por causar efeitos em uma variedade de espécies, como reduzir a qualidade espermática em *Neohelice granulata* (Canosa et al., 2019); alterar a taxa de sobrevivência, a resposta antioxidante e imune e ocasionar danos ao DNA de hemócitos do caranguejo *Eriocheir sinensis* (Hong et al., 2019); alterar a defesa imunológica e bioquímica da hemolinfa e a homeostasia celular do lagostim *Astacus leptodactylus* (Banaee et al., 2019); elevar a demanda energética e, conseqüentemente, aumentar a atividade alimentar no anfípoda *Gammarus fossarum* (Fumetti & Blaurock, 2018); reduzir as taxas de crescimento e as reservas de proteínas, lipídios e glicogênio muscular em lagostins *Cherax quadricarinatus* (Avigliano et al., 2014; Frontera et al., 2011); interferir na reprodução da pulga-d'água *Daphnia magna* (Cuhra et al., 2013) e alterar o metabolismo energético e as características reprodutivas do anfípoda *Hyaella castroi* (Dutra et al., 2011).

Em representantes da família Palaemonidae, os estudos mostram que há redução do consumo de oxigênio e excreção de amônia em *Palaemonetes argentinus* (Montagna & Collins,

2007), e estresse oxidativo e dano genotóxico em *Macrobrachium nipponensis* (Hong et al., 2018), quando expostos ao HBG. Ainda em *Macrobrachium*, pesquisas realizadas no LRDA, demonstraram que concentrações de HBG, ambientalmente relevantes (0,065 mg/L e 0,28 mg/L), comprometeram o sistema endócrino, causaram alterações histopatológicas nos compartimentos subcelulares das células epiteliais do hepatopâncreas e modularam a expressão de genes antioxidantes nos camarões de água doce *Macrobrachium potiuna* (Melo et al., 2019 a,b; Melo et al., 2020).

Tais resultados são um indicativo do possível comprometimento do ovário de *M. potiuna*, uma vez que o hepatopâncreas é responsável por sintetizar, armazenar e liberar proteínas, como a vitelogenina, durante o processo da maturação ovariana (Subramoniam, 2011) e que a ação de desregulador endócrino do HBG pode mimetizar hormônios relacionados a reprodução, alterando suas funções (Mensah et al., 2012; Armiliato et al., 2014). Deste modo, análises morfológicas e morfométricas tornam-se relevantes, pois além de exigir conhecimento prévio também são consideradas de baixo custo e podem fornecer informações valiosas sobre a ação do HBG na organização estrutural do ovário e na maturação das células germinativas de *M. potiuna*.

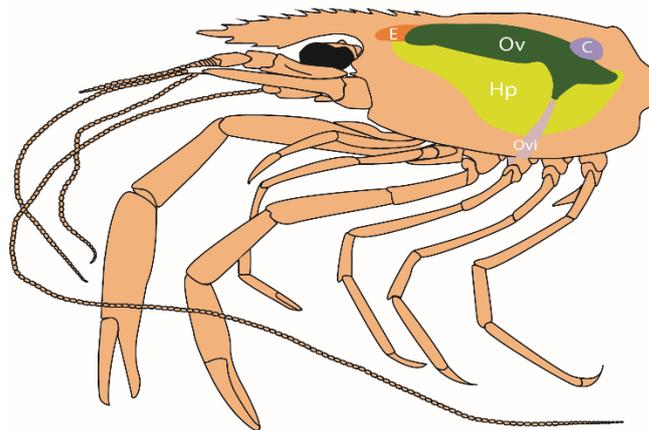
1.3 OVÁRIO COMO ORGÃO-ALVO DE HERBICIDAS

A espécie *M. potiuna*, descrita por Fritz Müller em 1880, é um palemonídeo endêmico da fauna brasileira (Bond-Buckup, & Buckup, 1989), com distribuição do Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Carvalho et al., 2013), tendo como habitat preferencial riachos de montanhas, caracterizados por possuírem correnteza, águas transparentes e fundo rochoso ou arenoso. Nestes ambientes esta espécie desempenha um importante papel na cadeia alimentar, participando da ciclagem de energia e no fluxo de nutrientes (Souza, et al., 1996; Mattos & Oshiro, 2009; Maciel & Valenti, 2009). No entanto, seus hábitos alimentares e de vida os mantêm em contato com poluentes do sedimento e da água, podendo desencadear riscos para esses organismos, como apresentado anteriormente por Melo et al., 2019a.

Na Ilha de Santa Catarina, *M. potiuna* foi coletada na bacia hidrográfica de Ratonés (Nazari et al., 2003) e na Cachoeira do Poção (Müller & Carpes, 1991, Melo et al., 2019a,b). Os indivíduos adultos desta espécie medem de 23 a 43 mm de comprimento total, atingem maturidade sexual aos 25 mm e pesam em média 2g (Müller & Carpes, 1991; Müller et al., 1999).

No gênero *Macrobrachium*, o sistema reprodutor das fêmeas é constituído por um par de ovários associados aos ovidutos, que se abrem nos gonóporos localizados na base do terceiro par de pereiópodos (Kroll et al., 1992). Uma estimativa do estágio da maturação ovariana pode ser obtida através do índice gonadossomático, um parâmetro reprodutivo importante para estimar a condição reprodutiva a partir das variações no crescimento das gônadas durante os ciclos reprodutivos (Carvalho et al., 1981; Chaves & Magalhães, 1993; Chang & Chi, 1995). Os ovários estão localizados na região dorsal do cefalotórax e apresentam características que podem ser acompanhadas macroscopicamente durante a maturação, como modificações na coloração, dimensões e posição em relação a outros órgãos, como estômago e hepatopâncreas (Carvalho, 1981; Mossolim & Bueno, 2002; Huang et al., 2010).

Figura 1: Posição do ovário maduro no cefalotórax de representantes do gênero *Macrobrachium* em relação aos demais órgãos.



Posição do ovário e ovidutos no gênero *Macrobrachium*, em relação ao coração (C), hepatopâncreas (Hp) e estômago (E). Adaptado de Mossolim & Bueno (2002).

A variação na coloração dos ovários resulta do acúmulo da proteína vitelina, uma lipoglicoproteína associada a pigmentos do tipo carotenoides. A vitelina é a principal proteína presente no vitelo, uma importante fonte de nutrientes para a maturação ovariana e para o desenvolvimento dos embriões (Charniaux-Cotton, 1985). Devido a incorporação da proteína vitelina e de lipídios para o interior das células germinativas, os ovários aumentam sua massa e, conseqüentemente, seu volume no cefalotórax (Lee & Chang, 1997). Quando imaturos, os ovários possuem tamanho reduzido e sua visualização restringe-se à área posterior do hepatopâncreas e, à medida em que ocorre a maturação, há um aumento em seu volume, de maneira a encobrir a porção dorsal do hepatopâncreas e do estômago (Figura 1) (Carvalho, 1981; Huang et al., 2010; Sooklang et al., 2012).

A caracterização morfológica das células germinativas foi descrita para algumas espécies de *Macrobrachium*, como *Macrobrachium acanthurus* (Carvalho, 1981), *Macrobrachium amazonicum* (Chavez & Magalhães, 1993; Ventura et al., 2019), *Macrobrachium roseberguii* (Chang & Shih, et al., 1995; Soonklahg et al., 2012) e *Macrobrachium asperulum* (Huang et al., 2010), permitindo definir estágios de maturação das células germinativas, células estas organizadas em estrutura folicular ou folículos. A maturação ovariana em *Macrobrachium* é caracterizada pela deposição de lipídios e proteínas no citoplasma dos ovócitos (vitelogênese), resultando no aumento do diâmetro destas células (Wilder et al., 2010).

A vitelogênese em *Macrobrachium* inicia-se a partir do crescimento das ovogônias localizadas na região central do ovário (Carvalho, 1981). Concomitante à vitelogênese, tem início a divisão celular, com a formação dos ovócitos pré-vitelogênicos, (Carvalho, 1981; Chaves & Magalhães, 1993; Chang & Shih, 1995). É durante a proliferação das ovogônias e no estágio pré-vitelogênico que os ovócitos aumentam a produção de ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e organelas responsáveis pela síntese de glicoproteínas e lipídios (Komm & Hinsh, 1987; Tiu et al., 2008). Ao final deste processo, estão formados os ovócitos vitelogênicos, localizados na região mais periférica do ovário e reconhecidos pelo acúmulo de vesículas lipídicas e de grânulos de vitelo (Carvalho, 1981; Chang & Shih, 1995; Huang et al., 2010; Soonklang et al., 2012). A fase seguinte, é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa e pelo aumento no número e dimensão das vesículas lipídicas e dos grânulos de vitelo acumulados por todo o citoplasma, indicando que o ovócito está maduro (O' Donovan et al., 1984; Soonklang et al., 2012; Ventura et al., 2019).

Os ovócitos maduros são liberados do ovário no estágio de meiose I e transferidos para a câmara incubadora, localizada na região ventral do abdome, onde serão fecundados e transportados durante todo desenvolvimento. As fêmeas de *M. potiuna* transportam em média de 30 ovos, ricos em vitelo e com formato levemente ovalado, característica de ovo centrolécito. O volume médio dos ovos é de 69,37 mm³. A riqueza de material nutritivo dos ovos de *M. potiuna* viabiliza o desenvolvimento embrionário mais lento que em outros palemonídeos, o que resulta na eclosão de uma pós-larva (Bond & Bockup, 1982; Müller & Carpes, 1991; Nazari et al., 2003; Müller et al., 2004).

M. potiuna, têm demonstrado ser um organismo adequado para estudos relacionados a toxicologia e reprodução, pois (i) possui ampla distribuição geográfica; (ii) populações numerosas; (iii) são facilmente mantidos em laboratório, devido ao seu pequeno porte e comportamento não agressivo; (iv) a maturação do ovário pode ser observada através da

transparência da carapaça; (v) podem ser considerados potenciais bioindicadores da contaminação aquática e (vi) estudos de caracterização dos ovários realizados em diferentes espécies do gênero *Macrobrachium* (Müller et al., 1990; Nazari et al., 2003; Mattos & Oshiro, 2009; Bentes et al., 2016, Melo et al., 2019a,b), o que facilita a análise da ação do HBG sobre a morfologia e morfometria das células germinativas durante a maturação ovariana.

O crescente aumento no uso de HBG na agricultura brasileira nas últimas décadas e conseqüentemente o comprometimento de organismos não-alvos por este herbicida, demonstra a importância de realizar estudos sobre esta temática. As gônadas, com destaque neste trabalho para os ovários, são estruturas de fundamental importância para o sucesso reprodutivo das espécies. Por outro lado, os ovários são sensíveis à toxicidade de poluentes, o que pode comprometer a integridade desse órgão. Para compreender a ação de HBG em ovários de crustáceos endêmicos da fauna brasileira, como o palemonídeo *M. potiuna* estabelecemos como hipóteses científicas para este estudo que a formulação comercial do HBG Roundup WG[®], (i) reduz o índice gonadosomático (IGS), (ii) compromete a organização estrutural das células germinativas, (iii) interfere no comprimento do maior e menor eixo das células germinativas e (iv) diminui a quantidade da proteína vitelina, proteínas totais e dos polissacarídeos ácidos e neutros presentes nos ovócitos de *M. potiuna* expostas ao HBG por 14 dias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do Roundup WG[®] sobre a morfologia, morfometria e o conteúdo de carboidratos e proteínas das células germinativas de ovários de *M. potiuna*, durante o processo de maturação ovariana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a morfologia dos ovários e reconhecer as categorias de células germinativas evidenciadas ao longo de sua maturação;

Avaliar o efeito da exposição ao Roundup WG[®] sobre a maturação ovariana utilizando como parâmetro o índice gonadosomático;

Avaliar a morfometria das células germinativas e núcleo para verificar se o Roundup WG[®] interfere no tamanho dos ovócitos de *M. potiuna*;

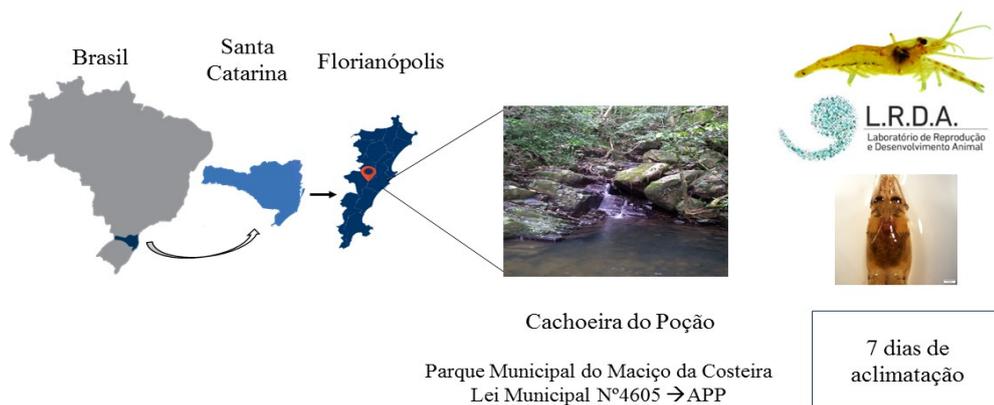
Analisar se o Roundup WG[®] interfere na quantificação da proteína vitelina, proteínas totais e polissacarídeos ácidos e neutros presentes nas células germinativas;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DAS FÊMEAS DE *MACROBRACHIUM POTIUNA*

Fêmeas de *M. potiuna* foram coletadas, no período de março a dezembro de 2019, em riacho de água doce conhecido como Cachoeira do Poção, localizado no Parque Municipal do Maciço da Costeira, Área de Preservação Permanente (APP) no município de Florianópolis, Ilha de Santa Catarina, Brasil (27°36'57,9" S, 48°30' 1,63" W) e transportadas em aquários portáteis de 16 litros até o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA/UFSC), onde as fêmeas foram reconhecidas pela ausência do apêndice sexual masculino no segundo par de pleópodos (Holthuis, 1952) (Figura 2).

Figura 2: Representação do local de coleta de *M. potiuna*.



Durante o período de sete dias de aclimação, as fêmeas foram mantidas em aquário de 30L contendo 20L de água corrente de clorada, com aeração constante, fotoperíodo natural, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 7,0 e alimentação diária com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish[®]). Os procedimentos de amostragem adotados neste estudo, foram aprovados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA-Autorização Permanente Nº 15294-1/2008).

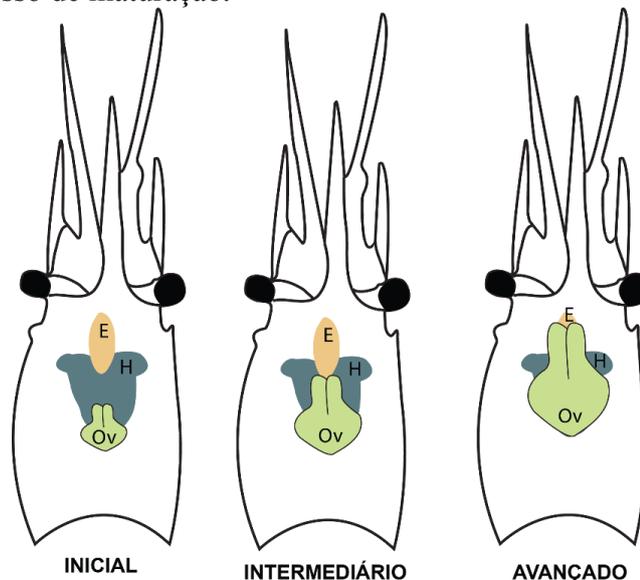
3.2 EXPOSIÇÃO DAS FÊMEAS DE *MACROBRACHIUM POTIUNA* AO ROUNDUP WG®

As fêmeas foram expostas a concentração de 0,065 e 0,28 mg de glifosato/L, sendo que tais concentrações foram preparadas em água dechlorada com base na quantidade de glifosato contida no Roundup WG® (Melo, 2019a). As fêmeas do grupo controle foram expostas apenas a água dechlorada (0,00 mg de glifosato/L). Durante a exposição, as fêmeas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura, aeração e fotoperíodo da aclimação.

A formulação comercial Roundup WG® (referido neste trabalho como RWG®), registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob N° 002094, contém 720,0 g/kg de ácido de N-(fosfometil)glicina (glifosato) em sua composição (Monsanto Brasil Ltda). A definição das concentrações do RWG® utilizadas neste estudo, foram baseadas nas concentrações máximas de glifosato permitidas pela Resolução N° 357 (CONAMA, 2005) para classes de água doce do Brasil.

As características como tamanho, coloração e posição dos ovários em relação ao hepatopâncreas e ao estômago, foram utilizadas para a categorização macroscópica dos ovários em inicial, intermediário e avançado, baseada na classificação descrita por Carvalho (1981) e Chang & Shih (1995) (Figura 3).

Figura 3: Representação da posição do ovário em relação ao estômago e hepatopâncreas de *M. potiuna* durante o processo de maturação.



Representação esquemática da posição dos ovários de *M. potiuna*, em relação ao estômago e hepatopâncreas, durante o estágio inicial, intermediário e avançado do processo de maturação. Ovário (Ov); Hepatopâncreas (H); Estômago (E). Fonte: Adaptado de Chang & Shih (2011).

Após a categorização macroscópica dos estágios ovarianos, as fêmeas foram distribuídas em três aquários de vidro de 6L, preenchidos com 3L do meio de exposição (0,00 controle; 0,065 e 0,28 mg/L RWG[®]) (n= 3 fêmeas/estagio da maturação ovariana/concentração). Para manter a qualidade da água e das concentrações do RWG[®], os meios de exposição foram totalmente renovados a cada quatro dias (Sinhorin et al., 2014). As fêmeas foram expostas durante 14 dias, tempo estimado para a meia vida do herbicida na água (Giesy *et al.*, 2000). Durante a exposição, as fêmeas foram alimentadas diariamente com ração comercial para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish[®]).

A água dos aquários contendo o herbicida RWG[®], foi descartada junto ao Sistema de Gestão de Resíduos Líquidos da UFSC.

3.3 BIOMETRIA CORPORAL E OVARIANA

Após o período de exposição, as fêmeas de *M. potiuna* foram dessensibilizadas por imersão em água gelada por 5 minutos. Em seguida, foi mensurado o comprimento total das fêmeas com o auxílio de paquímetro digital (mm) e a massa corporal em balança analítica (mg). Os ovários foram dissecados em microscópio estereoscópicos (4X) e a massa ovariana foi obtida em balança analítica (mg). O índice gonadossomático (IGS), foi calculado através da fórmula: (massa do ovário/massa da fêmea) x 100.

3.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Os ovários (n = 3 pares de ovários/estágio da maturação ovariana/grupo experimental) foram fixados em solução de Bouin alcoólico por 24 horas, lavados em três banhos de álcool 70% e armazenados em solução alcoólica 70% até o processamento. Os ovários foram desidratados em série alcoólica crescente por 30 minutos, diafanizados em xilol por 20 minutos e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados a 6 µm em micrótomo rotativo e as secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Em cada lâmina foram dispostas secções dos grupos controle e expostos ao RWG[®], de forma que, todos os grupos experimentais receberam o mesmo tratamento durante a realização dos procedimentos de coloração, histoquímica e imuno-histoquímica.

Para reconhecimento e análise da morfologia das células germinativas as secções foram desparafinizadas em xilol por 10 minutos, hidratadas em série alcoólica decrescente por 10 minutos cada, coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, contracoradas

com Eosina aquosa e lavadas com água destilada. Na sequência, as secções foram desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, montadas com Entellan[®] (Merck) e analisadas em microscópio de luz (10, 40 e 100X).

Para a realização semi-quantitativa das proteínas totais, polissacarídeos ácidos e neutros presentes no citoplasma das células germinativas, foram realizadas as técnicas Azul Brillante de Coomassie (CBB), Azul de Toluidina (ATO) e Ácido Periódico-Schiff (PAS, do inglês *Periodic Acid Schiff*), respectivamente. As secções foram colocadas em estufa a 45°C por 30 minutos, desparafinizadas em xilol, hidratadas em série alcoólica decrescente e lavadas em água destilada. Em seguida, as secções foram:

- coradas com o Azul Brillante de Coomassie por 4 minutos, lavadas em solução de Clark (ácido acético, álcool etílico, 1:3 v/v) por 5 minutos e passadas rapidamente em água corrente.
- coradas com Azul de Toluidina por 1 minuto e 30 segundos e lavada em água corrente.
- colocadas no Ácido Periódico por 30 minutos, lavadas em água corrente por 20 minutos, mergulhadas no Reativo de Schiff em ambiente escuro e por fim, as secções foram lavadas em água corrente por 20 minutos.

Após estes procedimentos, as secções foram colocadas na estufa por 1 hora a 45°C para secar, diafanizadas em xilol para a fixação da coloração e conservação do material, para posterior montagem das lâminas com Entellan[®] (Merck).

Para imunolocalizar e quantificar a proteína vitelina, as secções dos ovários foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em tampão fosfato salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4, sendo a atividade das peroxidases endógenas bloqueada pelo peróxido de hidrogênio em metanol (1:2 v/v). As secções foram permeabilizadas em PBS + Triton X-100 a 0,3% e incubadas com albumina sérica bovina a 5% (BSA, do inglês *bovine serum albumin*), por 1 hora, para inativar sítios inespecíficos e posterior incubação com anticorpo primário anti-vitelina (doado pela Dra. Esther Lubzens - *Oceanographic and Limnological Research* - Israel) por 12 horas a 4°C. As secções foram lavadas em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 180 minutos com anticorpo secundário Anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase. A revelação da reação foi realizada com solução contendo 3-3, diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio, e as lâminas foram montadas com Entellan[®] (Merck). Na reação por imuno-histoquímica, os controles negativos foram tratados da mesma maneira descrita acima, exceto pela incubação com o anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

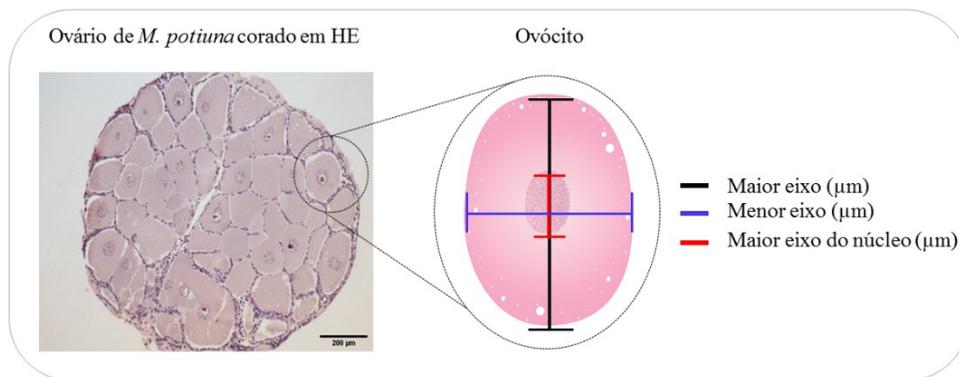
3.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Para estimar as condições reprodutivas das fêmeas, foi realizada a organização e distribuição da frequência dos dados em classes de IGS. A caracterização das células germinativas do ovário de *M. potiuna*, foi realizada com base nos estudos de Carvalho (1981), Chaves & Magalhães (1993) e Chang & Shih (1995), no qual foram consideradas características morfológicas como: (i) forma e tamanho das células, (ii) proporção núcleo/citoplasma, (iii) presença e distribuição de grânulos de vitelo e vacúolos (iv) núcleo e nucléolo visíveis.

Para a caracterização das células germinativas, análises morfométricas como: 1) medida do maior eixo da célula, 2) medida do menor eixo da célula e 3) medida do maior eixo do núcleo foram realizadas no *software Image-J* (Figura 4).

Quantificação dos conteúdos de polissacarídeos ácidos e neutros, proteínas totais e vitelina, foi realizada através de imagens obtidas no Microscópio Olympus BX41 com sistema de captura de imagens câmera digital colorida com 3.3 mpixel da Q-imaging e o programa Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging (LAMEB).

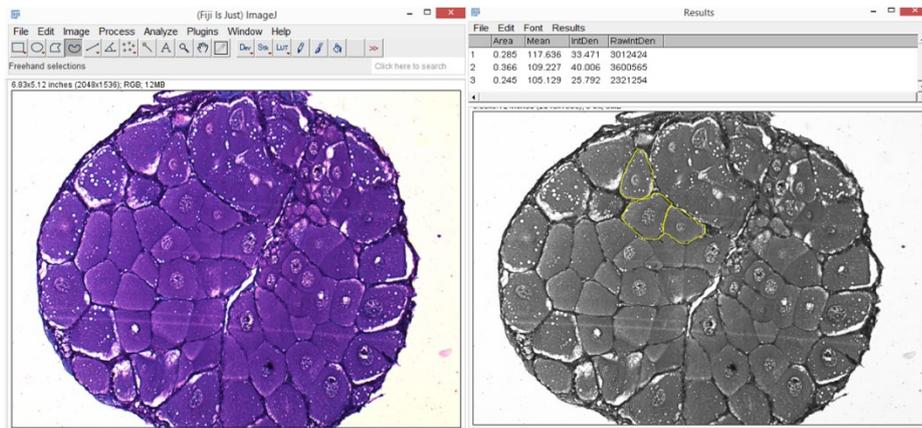
Figura 4: Representação das análises morfométricas realizadas a partir de secções coradas em HE.



O perfil das reações histoquímicas para a quantificação dos conteúdos de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas totais (ATO, PAS, CBB, respectivamente) e quantificação da proteína vitelina, foi realizada através da análise da Densidade Integrada (equivalente ao produto da área com o valor médio da cor de cinza), também disponível no *software Image-J* (Figura 5). Para esta análise, a imagem é transformada na escala de cores de cinza (8-bit) e, os ovócitos são contornados utilizando a ferramenta *Freehand selections* para quantificar a Densidade Integrada. No presente trabalho, foram utilizadas 3 secções por animal e mensurado

todos os ovócitos e com núcleo visualizados no microscópio de luz ($n = 3$ animais/estágio da maturação/concentração/duplicata).

Figura 5: Programa *Image J* versão 1.51k, análise da Densidade Integrada.



Análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 7,0*. Médias \pm Erro Padrão da Média (EPM) obtidos a partir das análises morfométricas e de densidade integrada dos diferentes grupos experimentais foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade (Shapiro Wilk e teste de Bartlett). Obedecendo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foram realizadas análises de variância ANOVA de uma via para verificar o efeito das concentrações (0,00 controle; 0,065 e 0,28 mg/L) nas diferentes técnicas avaliadas, seguido do teste post hoc de Tukey, com a significância de $p < 0,05$. Dados que não obedeceram aos pressupostos mencionados acima foram avaliados com teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido de um teste post hoc de Tukey com grau de significância de $p < 0,05$. A correlação de Person foi realizada para obtenção do valor de r entre as medidas do maior eixo das células germinativas e o maior eixo de seus respectivos núcleos.

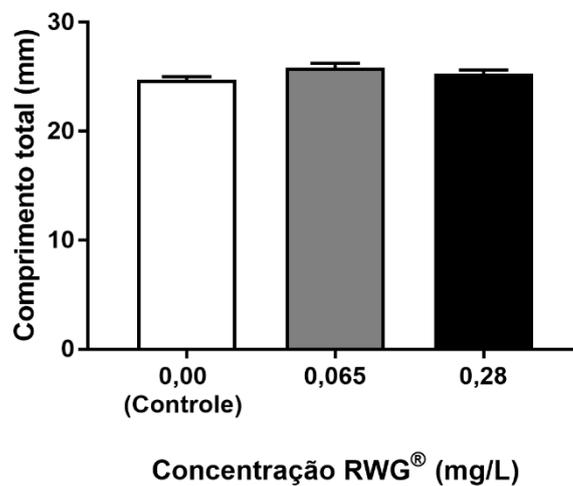
4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo analisam aspectos e características estruturais e morfométricas de ovários de *M. potiuna* expostos ao HBG e são indicadores importantes no contexto de uma análise morfológica da toxicidade reprodutiva.

4.1 EFEITO DO RWG[®] SOBRE O ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)

Para avaliar os efeitos de RWG[®] em fêmeas de *M. potiuna* foram analisados parâmetros biométricos como comprimento total (CT), massa corporal e ovariana em camarões expostos por 14 dias. As fêmeas do grupo controle apresentaram CT médio de 24,73 mm ($\pm 0,28$), não diferindo dos grupos expostos às concentrações de 0,065 e 0,28 mg/L do RWG[®], os quais apresentaram CT médio de 25,81 mm ($\pm 0,42$) e 25,3 mm ($\pm 0,34$), respectivamente (Figura 6).

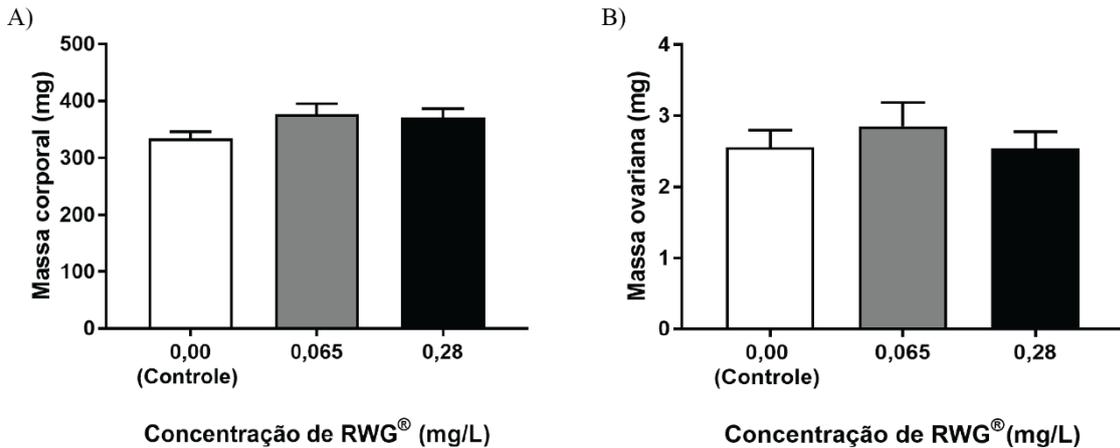
Figura 6: Comprimento total das fêmeas de *M. potiuna*, após a exposição ao RWG[®] por 14 dias.



Os resultados estão apresentados como média \pm EPM ($p > 0,05$).

Em relação a massa corporal, o grupo controle apresentou uma massa de 334,5 mg ($\pm 11,83$) que não diferiu dos grupos expostos ao RWG[®], que apresentaram média de 376,9 mg ($\pm 18,61$) no grupo exposto a concentração 0,065 mg/L e de 371,4 mg ($\pm 15,57$) no grupo 0,28 mg/L (Figura 7A). Na análise da massa ovariana, também não foi observada diferença significativa entre a média de 2,56 mg ($\pm 0,24$) do grupo controle, com a média de 2,85 mg ($\pm 0,34$) do grupo exposto a 0,065 mg/L e 2,54 mg ($\pm 0,24$) do grupo 0,28 mg/L (Figura 7B).

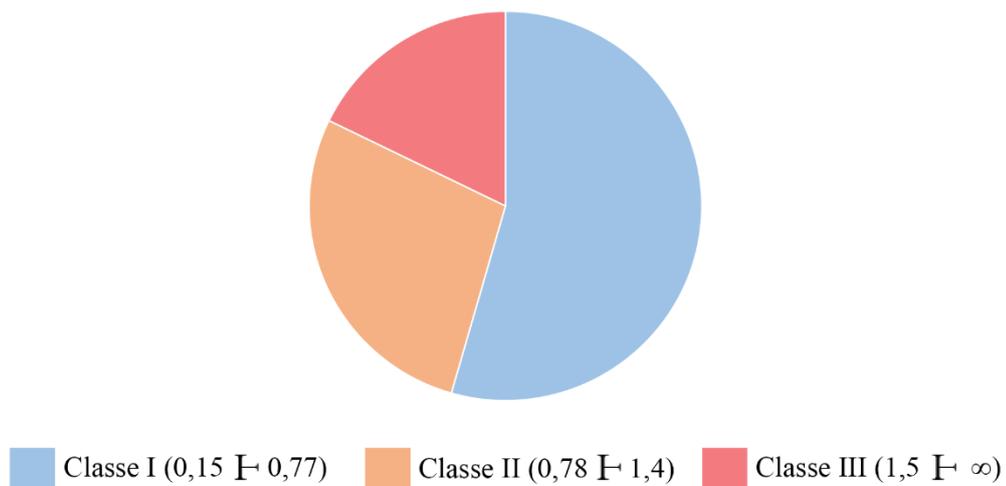
Figura 7: Massa corporal e ovariana de fêmeas de *M. potiuna* expostas ao RWG[®] durante 14 dias.



Os resultados estão apresentados como média \pm EPM ($p > 0,05$). (A) Massa corporal de *M. potiuna*. (B) Massa ovariana de *M. potiuna*.

A análise do IGS mostrou que o grupo controle ($0,83 \pm 0,09$) não diferiu do grupo exposto a $0,065$ ($0,87 \pm 0,10$) e a $0,28$ mg/L ($0,89 \pm 0,10$) de RWG[®] ($n = 30$ fêmeas/concentração). O IGS é um valor utilizado para caracterizar os estágios da maturação das gônadas, o que possibilitou distribuir os valores de IGS em três classes (Tabela 1) e estimar as condições reprodutivas das fêmeas, tanto do grupo controle quanto dos grupos expostos ao RWG[®] ($n = 90$ fêmeas). A classe I foi a mais representativa, com 52,22% das fêmeas, já a Classe II apresentou 34,44% e a Classe III 13,34% das fêmeas (Figura 8).

Figura 8: Distribuição das fêmeas de *M. potiuna* em classes, de acordo com o IGS.



A análise do IGS para cada classe, não demonstrou diferença entre as concentrações testadas em relação ao controle, no tempo de 14 dias de exposição (Tabela 1).

Tabela 1: Índice gonadosomático dos ovários de *M. potiuna*, por classe, após a exposição ao RWG[®] por 14 dias.

	Classe	IGS	Grupos experimentais RWG [®] (mg/L)		
			Controle	0,065	0,28
14 dias	Classe I	0,15 F 0,77	0,51 ($\pm 0,03$)	0,45 ($\pm 0,02$)	0,48 ($\pm 0,03$)
	Classe II	0,78 F 1,4	0,85 ($\pm 0,01$)	1,03 ($\pm 0,08$)	0,93 ($\pm 0,03$)
	Classe III	1,5 F ∞	1,80 ($\pm 0,06$)	1,84 (0,06)	2,01 ($\pm 0,07$)

(n = 30 fêmeas/concentração). Dados apresentados como média \pm EPM.

4.2 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO ROUNDUP WG[®] SOBRE A MORFOLOGIA DOS OVÁRIOS DE *MACROBRACHIUM POTIUNA*

Observou-se macroscopicamente, que o sistema reprodutor feminino de *M. potiuna* apresenta o ovário constituído por dois lobos simétricos, a partir dos quais emergem os ovidutos. O ovário está localizado dorsalmente e disposto sobre o hepatopâncreas, entre o coração e o estômago. A medida que os ovócitos amadurecem, características como coloração, quantidade de cromatóforos em sua superfície dorsal, dimensões e posição em relação ao hepatopâncreas e estômago, são identificadas, o que permitiu reconhecer três estágios da maturação ovariana, os quais estão relacionados com as classes, que foram organizadas a partir do IGS.

a) Classe I- Estágio Inicial (EI): os ovários apresentam coloração esbranquiçada com cromatóforos dispersos em sua superfície, de difícil observação a olho nu, sendo necessária a utilização do microscópio estereoscópico (10X) para a identificação deste estágio, uma vez que os ovários são visualizados na parte posterior do hepatopâncreas (Figura 9A).

b) Classe II- Estágio Intermediário (EIn): os ovários apresentam coloração verde oliva, com maior presença de cromatóforos e mais volumosos do que o estágio anterior. Estão posicionados sobre a região dorsal do hepatopâncreas, estendendo-se em direção ao estômago, sendo facilmente observados através da transparência da carapaça (Figura 9B).

c) Classe III- Estágio Avançado (AV): os ovários apresentam coloração verde escuro e sua superfície é rica em cromatóforos, encobrindo o hepatopâncreas e o estômago, podendo ser

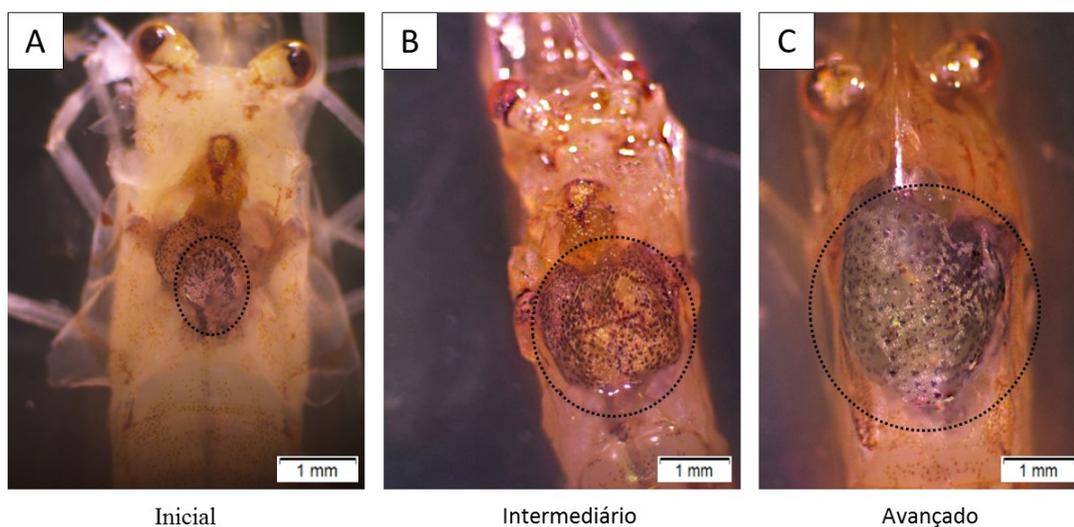
facilmente distinguido dos demais órgãos do cefalotórax (Figura 9C). Dentre os três estágios da maturação ovariana, este é o que apresenta maior volume do ovário.

Além dos três estágios de maturação ovariana acima descritos, foram observados também ovários de fêmeas ovígeras e/em desova. Estes ovários apresentavam-se translúcidos e de tamanho reduzido quando comparado às classes e estágios da maturação analisadas no presente trabalho (EI- EIn- AV).

Microscopicamente reconhecemos as mudanças morfológicas das células germinativas que ocorrem ao longo da maturação ovariana onde foi possível reconhecer e categorizar como: ovogônias (Og), ovócitos pré-vitelogênicos I (OPV-I), ovócitos pré-vitelogênicos II (OPV-II), ovócitos vitelogênicos I (OVI) e ovócitos vitelogênicos II (OVII) e ovócitos maduros (OM) (Figura 10).

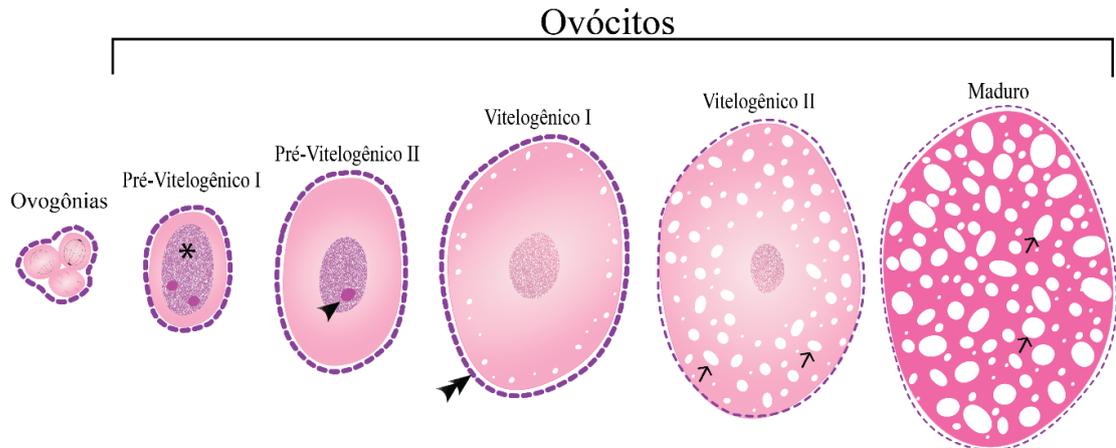
As Og, encontram-se organizadas em conjuntos na região central do ovário, são as menores células da linhagem germinativa e a maioria delas, encontram-se em divisão celular, o que dificulta a delimitação do citoplasma para a realização das análises morfométricas (Figura 11).

Figura 9: Morfologia externa do ovário de *M. potiuna*, não exposta ao RWG®.



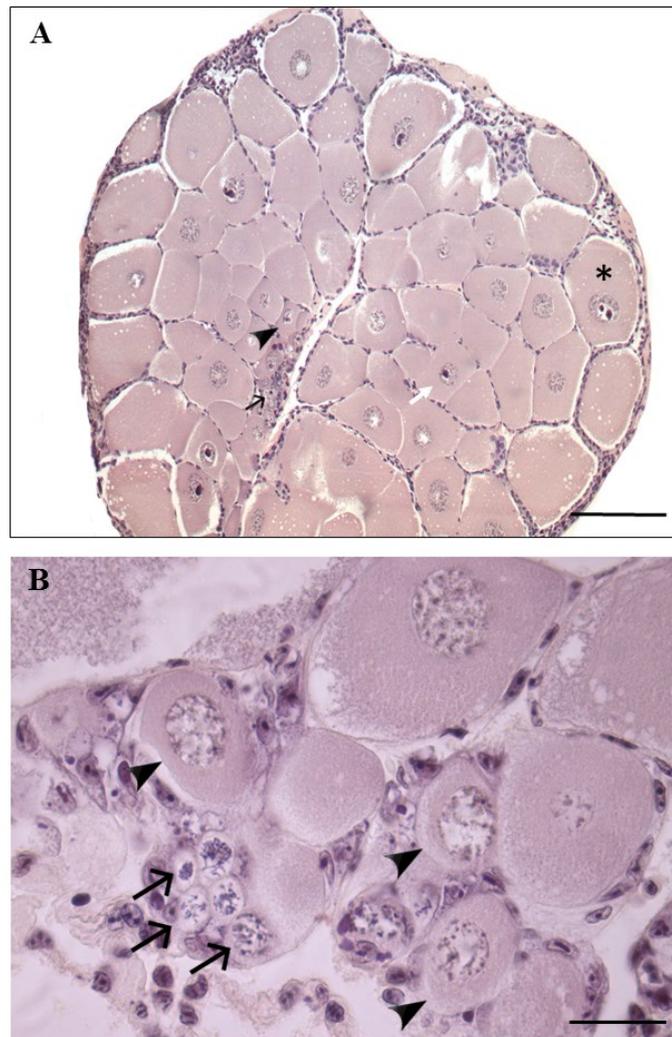
Estágios da maturação ovariana a partir da análise macroscópica dos ovários de *M. potiuna*. (A) Estágio inicial, (B) Estágio Intermediário, (C) estágio avançado. Ovários demarcados com círculos em pontilhados.

Figura 10: Representação das células germinativas do ovário de *M. potiuna*.



Núcleo (asterisco); nucléolos (cabeça de seta); células foliculares (dupla cabeça de seta), vesículas lipídicas (seta).
 Fonte: Adaptado de Chaves & Magalhães (1993) e Ventura et al., (2019).

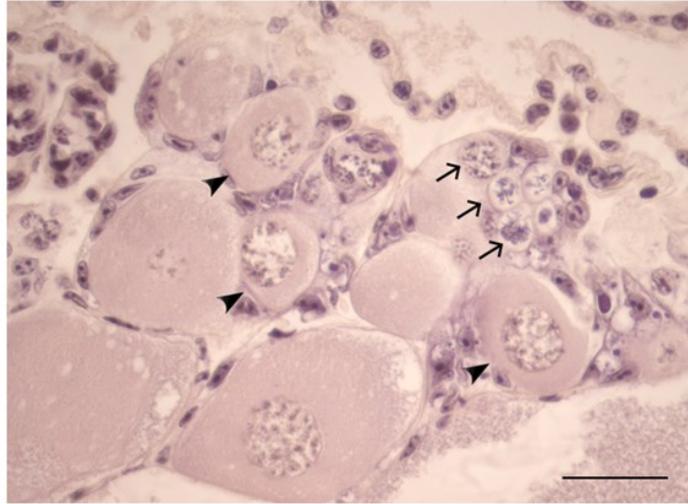
Figura 11: Corte transversal do ovário de *M. potiuna* não expostas ao RWG[®].



(A) Visão geral da organização estrutural do ovário de *M. potiuna*. Og na região central (seta preta), OPV-I (cabeça de seta); OPV-II (seta branca) e OV (asterisco). Barra de escala: 200 µm. (B) Og em divisão celular indicadas pelas setas pretas e OPV-I indicados pelas cabeças de seta. Barra de escala: 50 µm. Coloração HE.

Os OPV-I estão localizados na região central do ovário, próximos as Og, apresentam forma arredondada ou poligonal, citoplasma homogêneo, núcleo esférico com um ou mais nucléolos evidentes. A relação núcleo/citoplasma é de $r = 0,52$ (Figura 12). Os OPV-I encontram-se agrupados e envoltos por células foliculares, constituindo uma estrutura folicular.

Figura 12: Morfologia dos OPV-I de ovários de *M. potiuna* não expostos ao RWG®.



Corte transversal de ovário de *M. potiuna*. Og (setas pretas) e OPV-I (cabeça de seta). Barra de escala: 50 μm . Coloração HE.

Os OPV-II foram observados adjacentes às Og e dos OPV-I, em direção à periferia do ovário. Apresentam forma arredondada ou poligonal, citoplasma homogêneo, núcleo geralmente central e esférico, com um nucléolo visível. Diferenciam-se dos OPV-I principalmente pelo aumento do volume do citoplasma em relação ao núcleo ($r = 0,45$). À medida que ocorre a maturação dos ovócitos, as células foliculares se organizam para constituir os folículos ovarianos (Figura 13).

Figura 13: Morfologia dos OPV-II de ovários de *M. potiuna* não expostos ao RWG®.

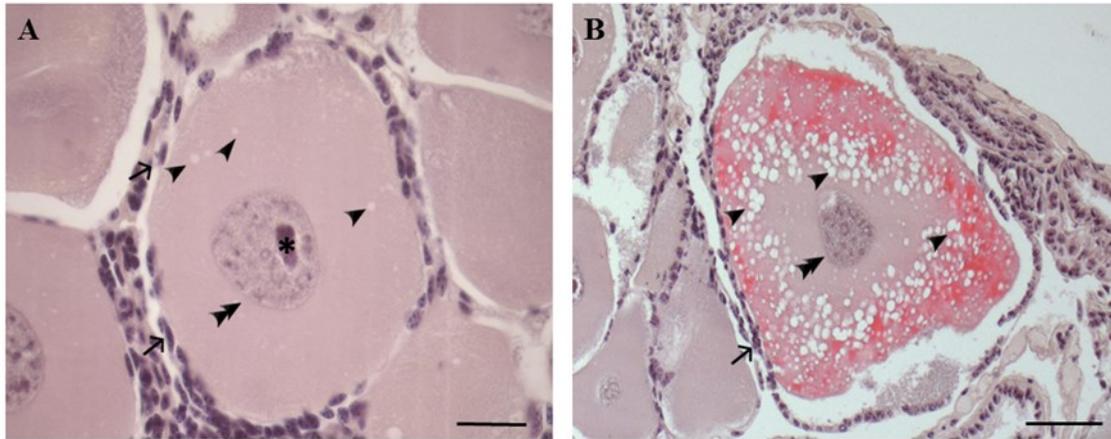


OPV-II (asterisco) circundado por células foliculares (seta preta). Presença de núcleo (cabeça de seta). Barra de escala: 50 um. Coloração HE.

Os OV-I foram reconhecidos por estarem posicionadas mais periféricas no ovário e possuírem forma poligonal, citoplasma apresentando vesículas lipídicas (conteúdo lipídico foi extraído pelo uso de solvente orgânico durante a realização das técnicas), dispostas na periferia do ovócito, núcleo geralmente central e esférico, podendo ou não apresentar nucléolo (Figura 14A). A relação núcleo/citoplasma é de $r = 0,29$. Já os OV-II, diferem dos anteriores, pelo gradual preenchimento do citoplasma pelas vesículas lipídicas e a relação núcleo/citoplasma é de $r = 0,20$. Neste momento da maturação, as células foliculares são facilmente reconhecidas por apresentarem forma alongadas e envolverem individualmente os ovócitos, formando folículos ovarianos (Figura 14B).

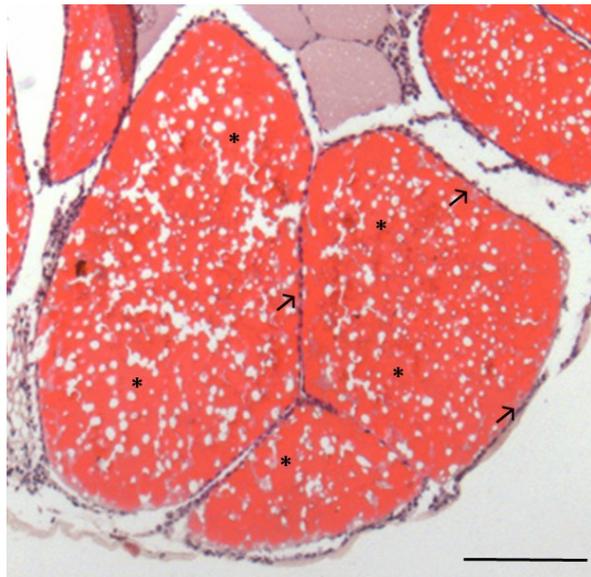
Os OM foram identificados na região periférica do ovário, apresentaram forma poligonal, citoplasma preenchido por grânulos de vitelo e vesículas lipídicas, não sendo observado o núcleo. Em relação à morfologia dos ovócitos, não foram observadas alterações morfológicas nas células germinativas dos ovários de *M. potiuna*, expostas às concentrações de 0,065 e 0,28 mg/L de RWG®, quando comparadas ao controle (Figura 15).

Figura 14: Morfologia dos OV-I e II de ovários de *M. potiuna* não expostos ao RWG®.



(A) Ovócitos vitelogênicos I circundados por células foliculares (seta preta), com presença de núcleo (dupla cabeça de seta), nucléolo (asterisco) e vesículas lipídicas (cabeça de seta). Escala: 50 um. (B) Ovócito vitelogênicos II circundado por células foliculares alongadas (seta preta), formando um folículo ovariano. Presença de núcleo (dupla cabeça de seta) e maior quantidade de vesículas lipídicas que os anteriores. Barra de escala: 200 um. Coloração HE.

Figura 15: Morfologia dos OM de ovários de *M. potiuna* não expostos ao RWG®.



Ovócitos maduros circundados por células foliculares alongadas (seta preta), formando um folículo ovariano. Ovócito preenchidos por grânulos de vitelo (asterisco). Barra de escala: 500 um. Coloração HE.

4.3 EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO ROUNDUP WG[®] SOBRE A MORFOMETRIA DOS OVÓCITOS DO OVÁRIO DE *MACROBRACHIUM POTIUNA*

4.3.1 Efeito do Roundup WG[®] sobre o comprimento do maior eixo das células germinativas do ovário de *Macrobrachium potiuna*

Com base na categorização das células germinativas para ovários de *M. potiuna*, a Tabela 2 apresenta o número total de OPV-I e II, OV-I e II e OM mensurados quanto ao comprimento do maior e menor eixo nos três grupos experimentais (controle, 0,065 e 0,28 mg/L) e para cada classe de IGS.

Tabela 2: Número de OPV-I e II, OV-I e II e OM, mensurados quanto ao comprimento do menor e maior eixo/concentração/classe de IGS.

Número médio de ovócitos mensurados						
Ovócitos		OPV-I	OPV-II	OV-I	OV-II	OM
Concentrações						
Classe I	0,00 (controle)	34	109	80	17	0
	0,065 mg/L	24	91	65	21	0
	0,28 mg/L	25	118	105	6	0
Classe II	0,00 (controle)	56	119	120	5	0
	0,065 mg/L	55	60	106	0	0
	0,28 mg/L	30	49	84	1	0
Classe III	0,00 (controle)	17	47	45	4	33
	0,065 mg/L	27	33	75	0	64
	0,28 mg/L	14	24	53	5	41

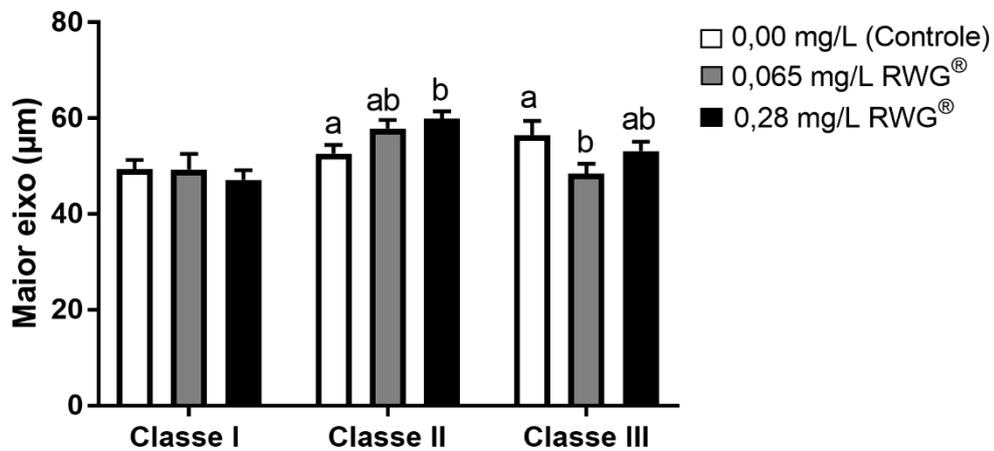
Dados apresentados como média. Ovócito Pré-Vitelogênico I (OPV-I); Ovócito Pré-Vitelogênico II (OPV-II); Ovócito vitelogênicos I (OV-I); Ovócito Vitelogênico II (OV-II); Ovócito Maduro (OM).

OPV-I da Classe I, expostos a concentração de 0,065 e 0,28 mg/L RWG[®], não apresentaram diferenças nas medidas do maior eixo quando comparados ao grupo controle ($F = 0,2592$, $p = 0,7723$). Já os OPV-I dos ovários da Classe II, expostos à 0,28 mg/L RWG[®] apresentaram um aumento significativo nas medidas do maior eixo, diferindo apenas do grupo controle ($F = 4,023$, $p = 0,0200$). Entretanto, na Classe III, foi observado uma redução significativa do maior eixo dos ovócitos OPV-I, quando expostos à concentração de 0,065 mg/L RWG[®], diferindo apenas do grupo controle ($F = 3,14$, $p = 0,05$) (Figura 16).

Nos OPV-II dos ovários da Classe I, não foi observado efeito significativo das concentrações 0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®] na medida do maior eixo, quando comparado

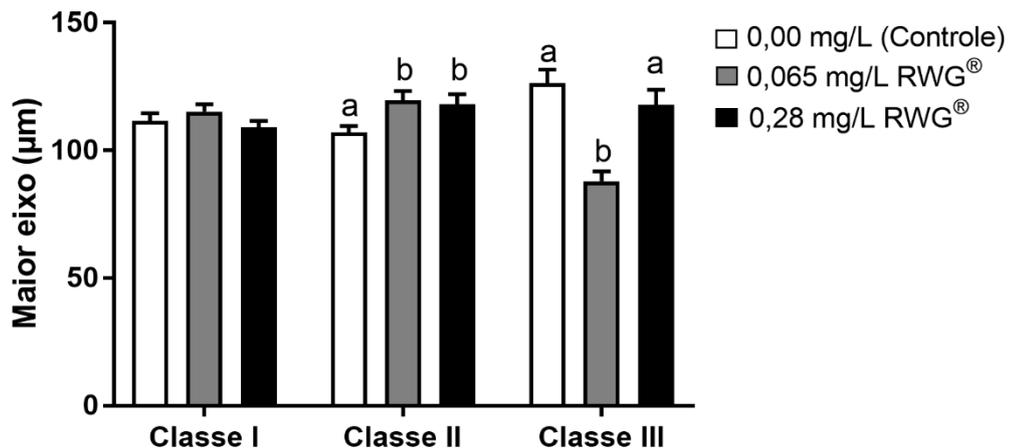
ao grupo controle ($H = 1,182$, $p = 0,3081$). Porém, nos ovários da Classe II, ambas as concentrações de RWG[®] apresentaram um aumento significativo do maior eixo dos OPV-II em relação ao grupo controle ($H = 9,999$, $p = 0,0067$). Já nos ovários da classe III, apenas OPV-II expostos à 0,065 mg/L RWG[®] apresentaram uma redução do maior eixo ($F = 14,98$, $p < 0,0001$), diferindo do grupo controle e do grupo exposto à 0,28 mg/L RWG[®] (Figura 17).

Figura 16: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos OPV-I de ovários de *M. potiuna* das classes I, II e III, após a exposição por 14 dias.



Média \pm EPM do comprimento do maior eixo dos OPV-I. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias ($n = 3$ fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

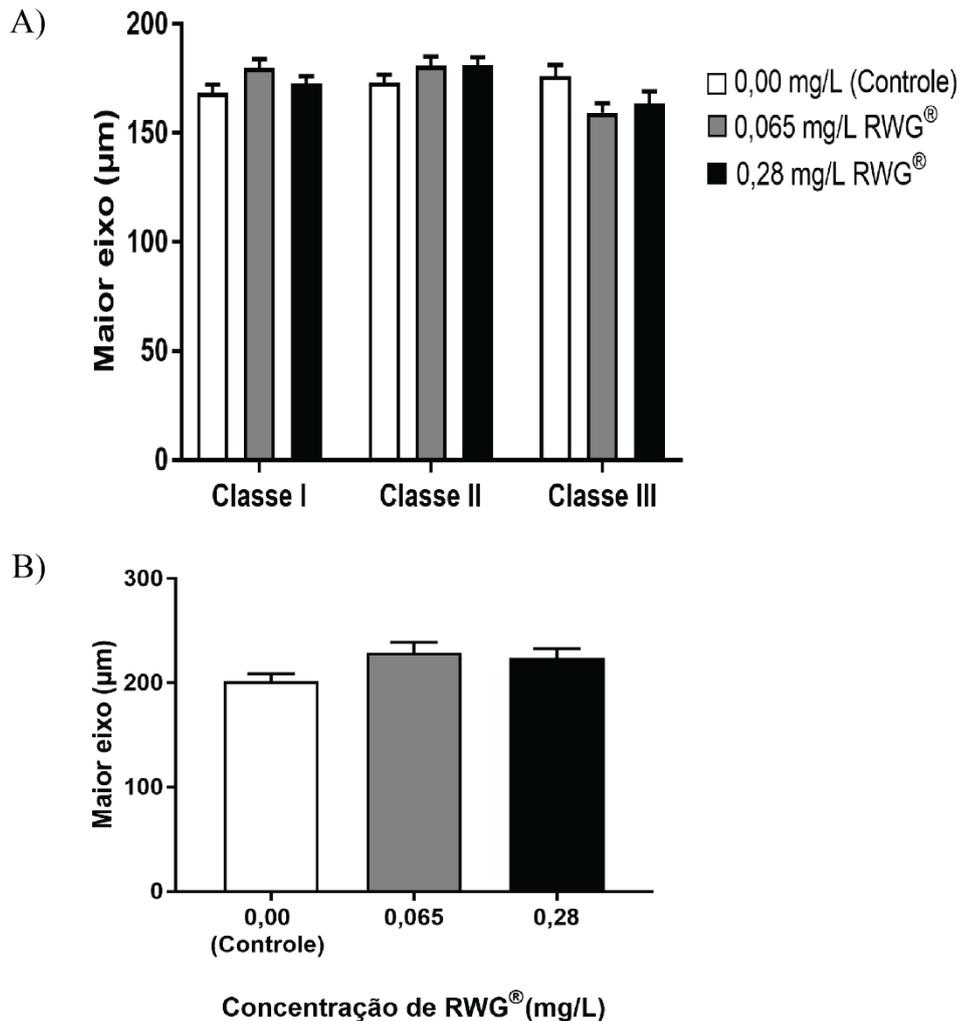
Figura 17: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos OPV-II de ovários de *M. potiuna* das classes I, II e III, após exposição por 14 dias.



Média \pm EPM do comprimento do maior eixo dos OPV-II. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. ($n = 3$ fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Nos OV-I das três classes de IGS (Figura 18A, $F = 2,078$, $p = 0,1270$; $H = 3,444$, $p = 0,17$; $F = 2,717$, $p = 0,0689$, respectivamente) e os OV-II de ovários da Classe I (Figura 18B, $F = 2,986$, $p = 0,0604$) não apresentaram diferenças nas medidas do maior eixo após 14 dias de exposição às concentrações 0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®].

Figura 18: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos OV-I de ovários de *M. potiana* das classes I, II e III e de OvV-II de ovários da Classe I, após 14 dias de exposição.

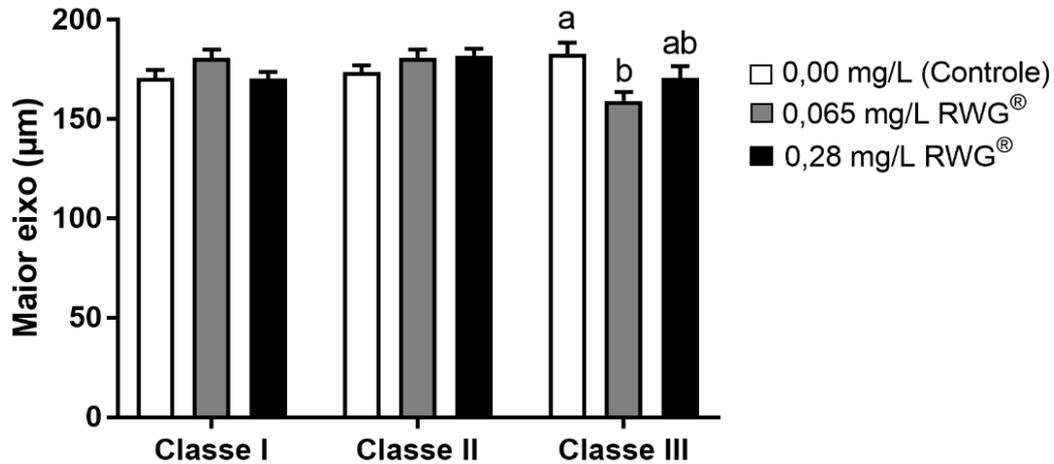


Média \pm EPM do comprimento do maior eixo dos OV-I e II. ($n = 3$ fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata) ($p > 0,05$).

Considerando o número de OV-II nas Classes II e III (Tabela 2) e os resultados apresentados na Figura 18, optou-se por unir os valores obtidos para OV-I e II em todas as classes de IGS, em um único grupo, Ovócitos Vitelogênicos (OV). A análise do comprimento do maior eixo destes ovócitos de todas as classes, demonstrou uma diminuição apenas nos OV

da Classe III expostos à menor concentração (0,065 mg/L), em relação ao seu grupo controle ($F = 4,679$, $p = 0,0104$).

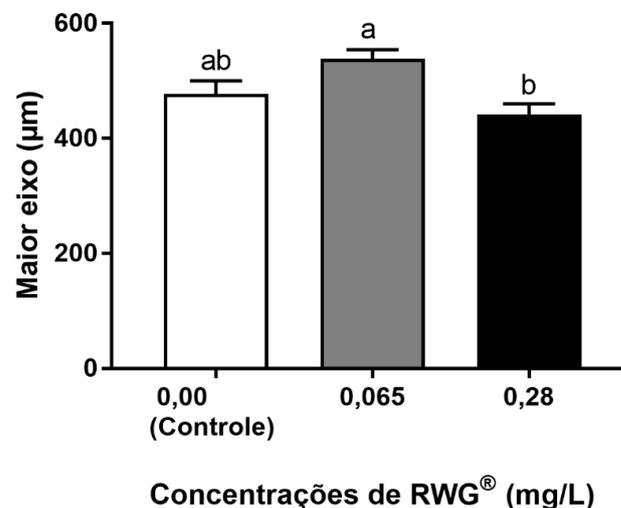
Figura 19: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos OV dos ovários das classes I, II e III de *M. potiuna*, após 14 dias de exposição.



Média \pm EPM do comprimento do maior eixo dos OV. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. ($n = 3$ fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Nos OM, encontrados apenas na Classe III, nenhuma diferença foi observada no comprimento do maior eixo destas células após a exposição por 14 dias às concentrações 0,065 mg/L e a 0,28 mg/L RWG[®] em comparação com o grupo controle, sendo observada diferença estatísticas apenas entre os grupos expostos ao RWG[®] ($F = 8,122$, $p = 0,0005$) (Figura 20).

Figura 20: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos OM de ovários de *M. potiuna* da Classes III, após 14 dias de exposição.



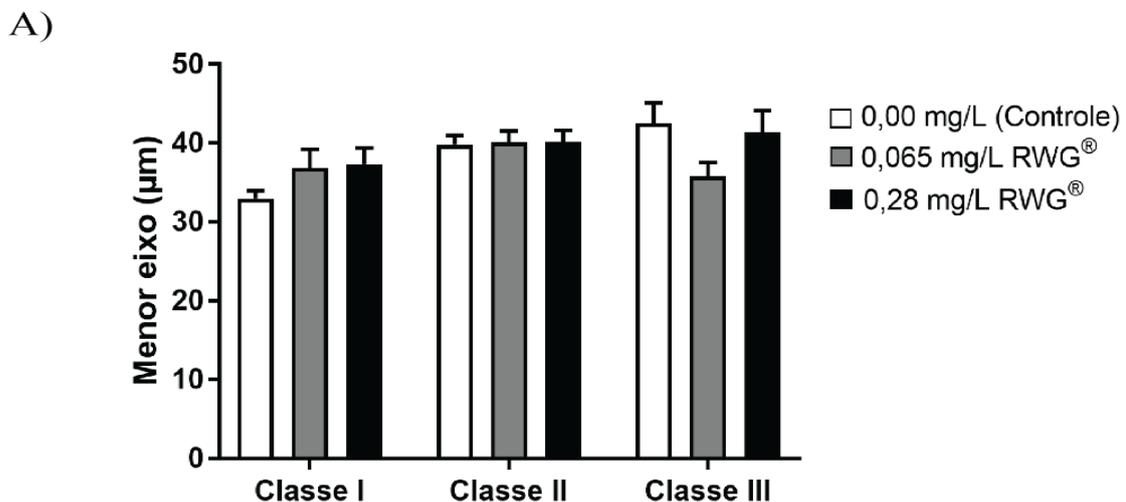
Média \pm EPM do comprimento do maior eixo dos OM. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

4.3.2 Efeito do Roundup WG[®] sobre o comprimento do menor eixo das células germinativas de ovários de *Macrobrachium potiuna*

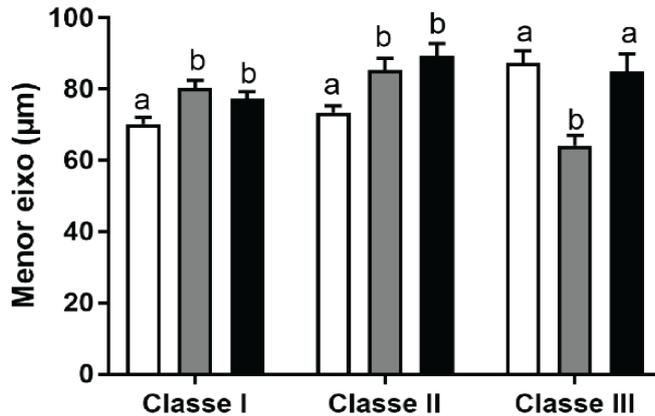
OPV-I dos ovários das Classes I, II e III, expostos às concentrações 0,065 e a 0,28 mg/L RWG[®], não apresentaram diferenças nas medidas do menor eixo ($F = 1,967$, $p = 0,1467$; $F = 0,02072$, $p = 0,9795$; $F = 2,853$, $p = 0,0663$, respectivamente) (Figura 21A). Entretanto, os OPV-II dos ovários das Classes I e II apresentaram um aumento significativo do menor eixo quando expostos à ambas concentrações de RWG[®], diferindo apenas de seus respectivos controles ($F = 6,174$, $p = 0,0023$; $H = 9,999$, $p = 0,0067$). Já nos ovários da Classe III, foi observado uma redução do menor eixo dos OPV-II na concentração de 0,065 mg/L RWG[®], a qual diferiu do grupo controle e do grupo 0,28 mg/L ($F = 12,46$, $p < 0,0001$) (Figura 21B).

Não foram observadas diferenças na morfometria do menor eixo dos OV dos ovários da Classe I, expostos às concentrações de 0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®] em relação ao grupo controle ($F = 0,1298$, $p = 0,8786$). Os OV dos ovários da Classe II, expostas a concentração de 0,28 mg/L RWG[®], apresentaram aumento significativo no menor eixo das células, diferindo apenas do grupo controle ($F = 4,296$, $p = 0,0145$). Por outro lado, os OV dos ovários da Classe III apresentaram uma redução do menor eixo quando expostos à concentração de 0,065 mg/L RWG[®] em relação ao grupo controle ($F = 5,435$, $p = 0,0052$) (Figura 22).

Figura 21: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do menor eixo dos OPV-I e II de ovários de *M. potiuna* da Classes I, II e III, após 14 dias de exposição.



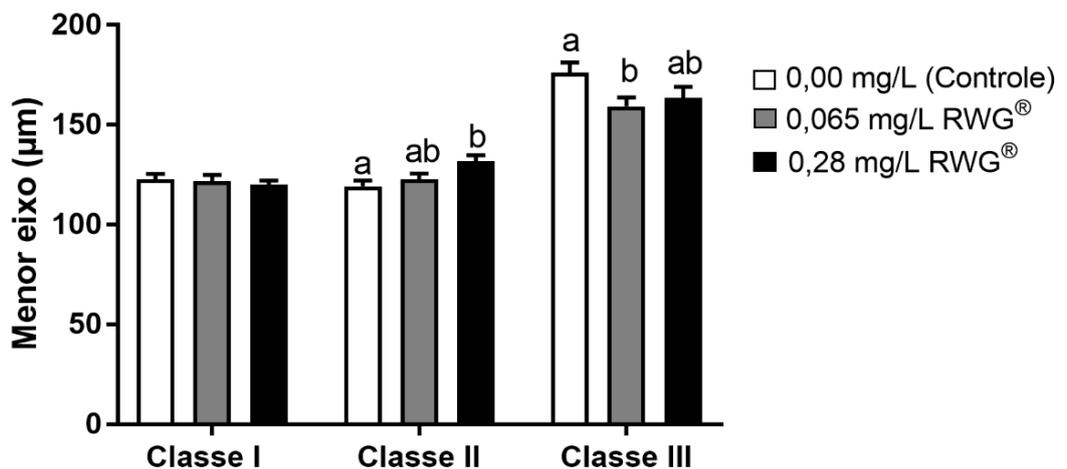
B)



Média ± EPM do comprimento do menor eixo dos OPV-I e II. (A) Comprimento do menor eixo dos OPV-I. (B) Comprimento do menor eixo dos OPV-II. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

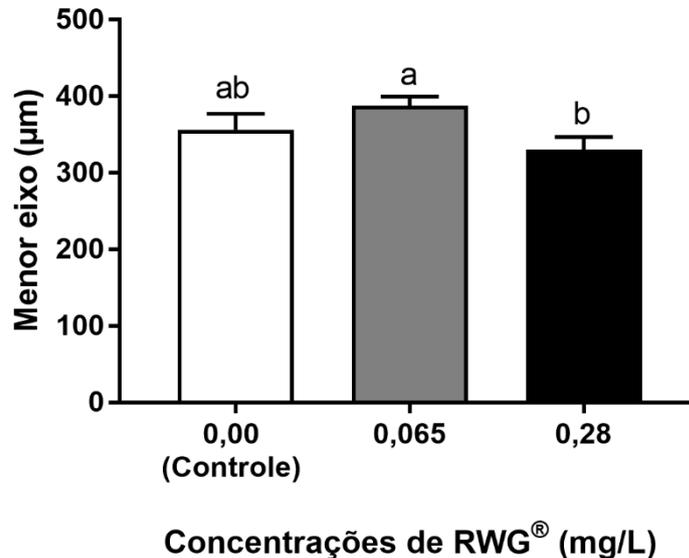
Os OM visualizados apenas na Classe III e expostos às concentrações 0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®], não apresentaram diferenças no comprimento do menor eixo quando comparados ao controle, sendo que os valores diferiram apenas entre as duas concentrações de RWG[®] ($F = 3,773$, $p = 0,0255$) (Figura 23).

Figura 22: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do menor eixo dos OV de ovários de *M. potiuna* da Classes I, II e III, após 14 dias de exposição.



Média ± EPM do comprimento do menor eixo dos OV. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração/duplicata). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Figura 23: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do menor eixo dos OM de ovários de *M. potiuna* da Classes III, após 14 dias de exposição.



Média \pm EPM do comprimento do menor eixo dos OM. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

4.3.3 Efeito do RWG[®] sobre a morfometria do núcleo das células germinativas do ovário de *Macrobrachium potiuna*

As análises da morfometria dos núcleos dos OPV-I e II da Classe I não apresentaram diferenças significativas ($F = 0,1719$, $p = 0,8424$; $H = 0,07441$, $p = 0,9635$, respectivamente). Por outro lado, os OV-I da Classe I, demonstraram um aumento significativo no maior eixo dos núcleos quando expostos à concentração de 0,065 mg/L de RWG[®], diferindo tanto do grupo controle quanto da maior concentração testada ($F = 9,434$, $p = 0,0089$). Os núcleos dos OV-II expostos à concentração de 0,28 mg/L de RWG[®], também apresentaram um aumento em seu maior eixo em comparação com seu grupo controle e com a concentração de 0,065 mg/L ($H = 13,23$, $p = 0,0013$). Entretanto, na Classe II, não foram observadas diferenças no comprimento do maior eixo dos núcleos (OPV-I - $F = 1,297$, $p = 0,2765$; OPV-II - $F = 2,913$, $p = 0,0563$; OV-I - $F = 1,599$, $p = 0,2037$). Por outro lado, OPV-I e II da Classe III, expostos à concentração de 0,065 mg/L de RWG[®], demonstraram uma redução significativa no comprimento do maior eixo de seus núcleos, diferindo apenas do grupo controle (OPV-I - $F = 6,412$, $p = 0,0031$; OPV-II - $F = 6,545$, $p = 0,0021$). Tal redução do maior eixo também ocorreu em núcleos de OV-I da Classe III, quando expostos à concentração de 0,28 mg/L de RWG[®], diferindo do grupo controle e do grupo exposto à 0,065 mg/L de RWG[®] ($F = 6,499$, $p = 0,0019$) (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do RWG[®] sobre o comprimento do maior eixo dos núcleos das células germinativas de ovários de *M. potiuna* das Classes I, II e III, após 14 dias de exposição.

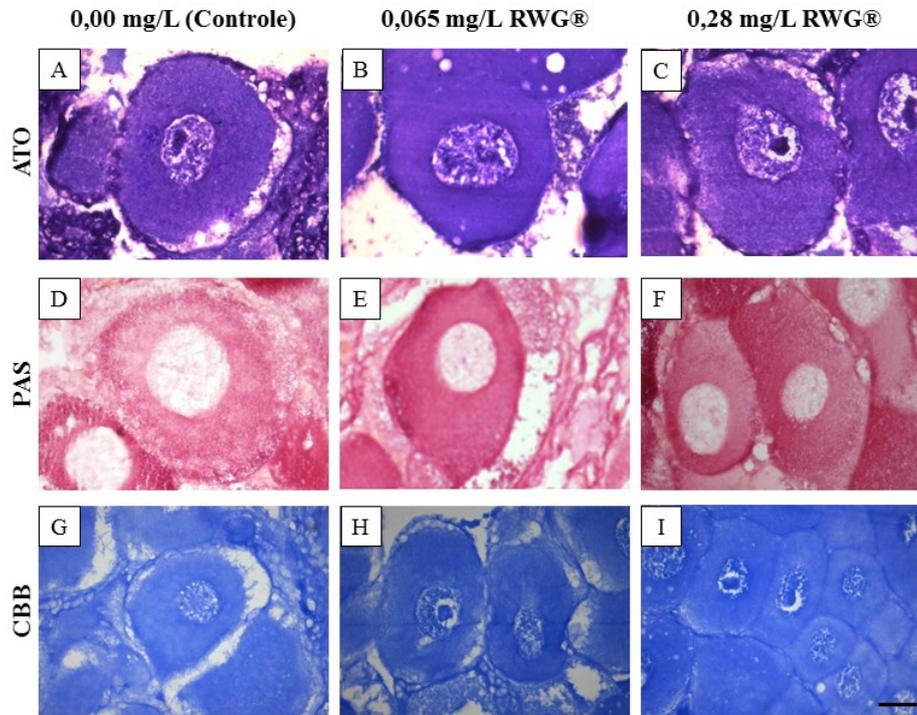
		NÚCLEO			
Ovócito	Concentração	OPV-I	OPV-II	OV-I	OV-II
	Classe I	CONTROLE	26,71 ± 0,89	45,65 ± 1,30	52,49 ± 1,36 ^a
0,065 mg/L		26,21 ± 1,65	45,36 ± 1,05	57,86 ± 1,44 ^b	62,71 ± 2,46 ^a
0,28 mg/L		25,72 ± 1,26	45,42 ± 1,04	55,01 ± 0,95 ^{ab}	71,72 ± 1,41 ^b
Classe II	CONTROLE	31,02 ± 1,05	49,93 ± 0,97	60,05 ± 1,30	-
	0,065 mg/L	28,97 ± 0,98	49,0 ± 1,38	56,78 ± 1,38	-
	0,28 mg/L	30,85 ± 1,04	49,51 ± 1,62	57,5 ± 1,65	-
Classe III	CONTROLE	31,17 ± 1,57 ^a	46,61 ± 1,71 ^a	54,88 ± 2,11 ^a	-
	0,065 mg/L	25,67 ± 0,85 ^b	38,6 ± 1,27 ^b	52,47 ± 1,10 ^a	-
	0,28 mg/L	27,35 ± 0,99 ^{ab}	42,3 ± 1,95 ^{ab}	46,78 ± 1,64 ^b	-

Média ± EPM do comprimento do maior eixo dos núcleos das OPV-I, OPV-II, OV-I, OV-II. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dia (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). (Teste de Tukey HSD, p < 0,05).

4.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 14 DIAS AO RWG[®] SOBRE OS CONTEÚDOS DE PROTEÍNAS TOTAIS, POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS E NEUTROS E PROTEÍNA VITELINA NOS OVÁRIOS DE *MACROBRACHIUM POTIUNA*

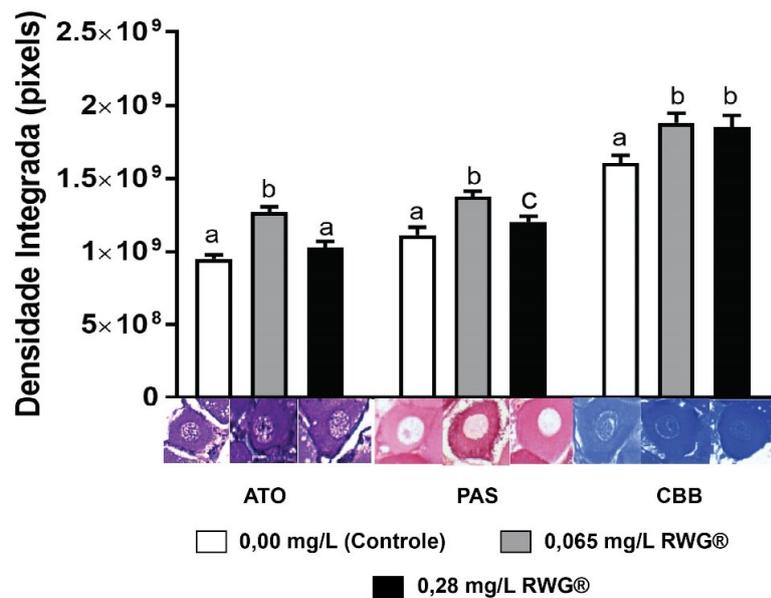
A partir da análise de ATO, observou-se um aumento no conteúdo de polissacarídeos ácidos nos OPV expostos à concentração de 0,065 mg/L RWG[®], diferindo do grupo controle e 0,28 mg/L RWG[®] (H = 55,79, p < 0,0001). A quantificação dos polissacarídeos neutros por meio da histoquímica de PAS, demonstrou um aumento deste tipo de carboidrato em ambas as concentrações testadas (0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®]) quando comparadas ao controle (H = 34,55, p < 0,0001). Similarmente, observamos um aumento dos conteúdos das proteínas totais nas duas concentrações de RWG[®], por meio da análise histoquímica de CBB (H = 9,925, p = 0,0070) (Figura 24 e 25).

Figura 24: Densidade integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OPV de ovários de *M. potiuna* após 14 dias de exposição ao RWG®.



Corte transversal de ovário de *M. potiuna*. Histoquímica dos OPV (A, B e C) em ATO, (D, E e F) PAS e (G, H e I). Barra de escala: 50 μ m.

Figura 25: Efeito do RWG® no conteúdo de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas totais dos OPV, após exposição por 14 dias.

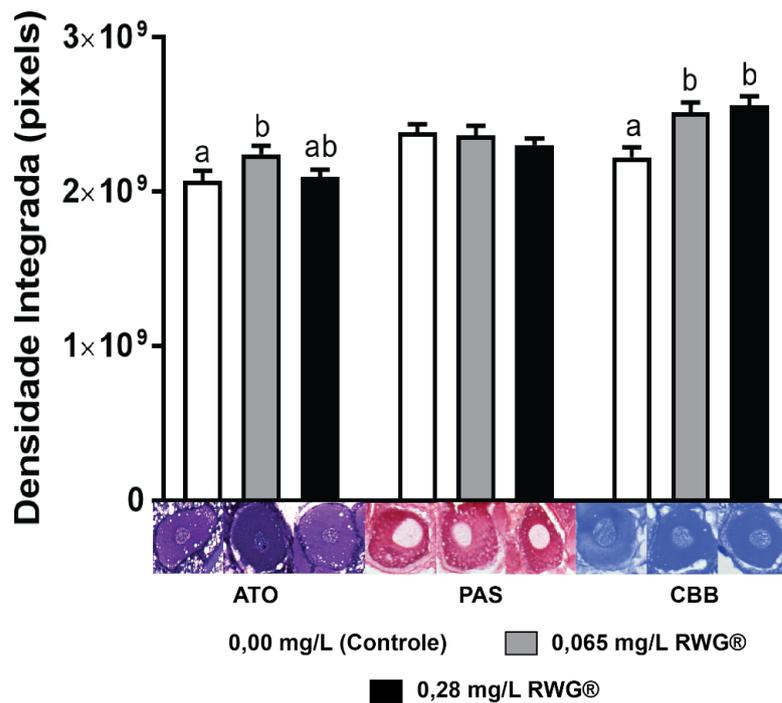


Média \pm EPM da densidade integrada (pixels) do conteúdo de polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). ATO = Azul de Toluidina, PAS = Ácido Periódico de Schiff, CBB = Azul Brillhante de Comassie. (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Nos OV, verificou-se um aumento do conteúdo de polissacarídeos ácidos na concentração de 0,065 mg/L RWG® em relação ao grupo controle ($H = 10,53$, $p = 0,0052$). Por outro lado, não foram observadas diferenças nos conteúdos de polissacarídeos neutros ($H = 0,9013$, $p = 0,6372$), porém, um aumento no conteúdo de proteínas totais foi observado nas duas concentrações de RWG® ($F = 14,09$, $p < 0,0001$) (Figura 26 e 27).

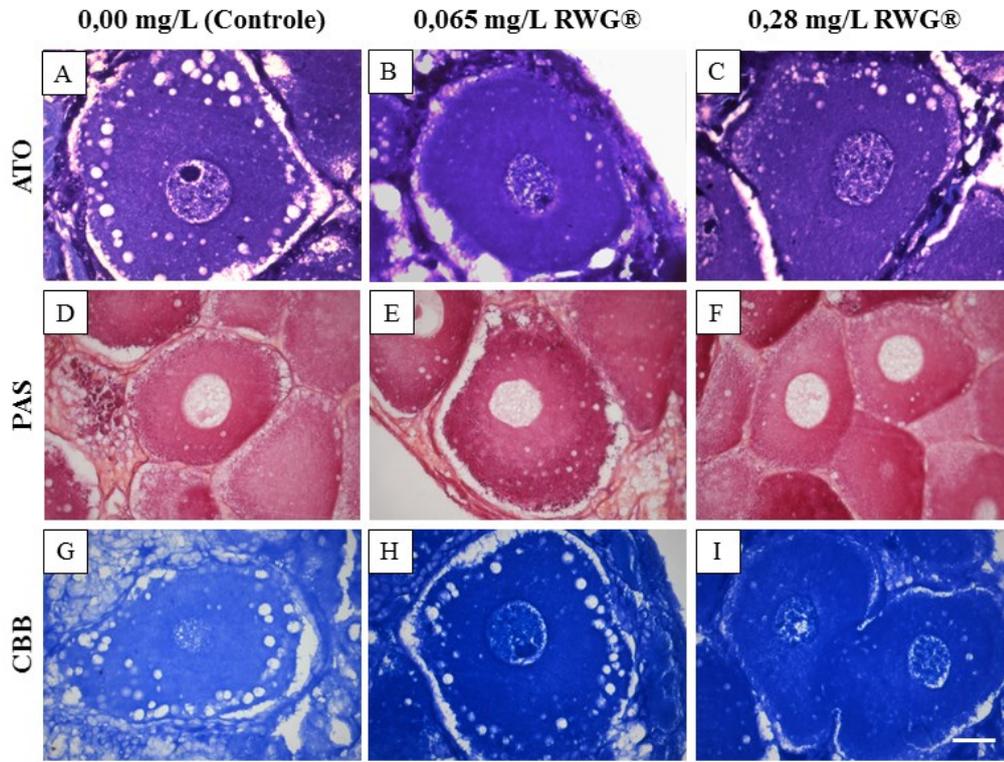
Em OM, observou-se uma redução do conteúdo de polissacarídeos ácidos na maior concentração de RWG® em comparação com os demais grupos ($H = 0,3063$, $p < 0,0001$). Um aumento no conteúdo de polissacarídeos neutros foi observado apenas na menor concentração de RWG® em comparação com os demais grupos ($F = 46,66$, $p < 0,0001$). O mesmo aumento foi observado no conteúdo de proteínas totais na concentração 0,065 mg/L RWG®, diferindo dos demais grupos experimentais ($F = 70,87$, $p < 0,0001$) (Figura 28 e 29).

Figura 26: Densidade Integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OV de ovários de *M. potiuna* após 14 dias de exposição ao RWG®.



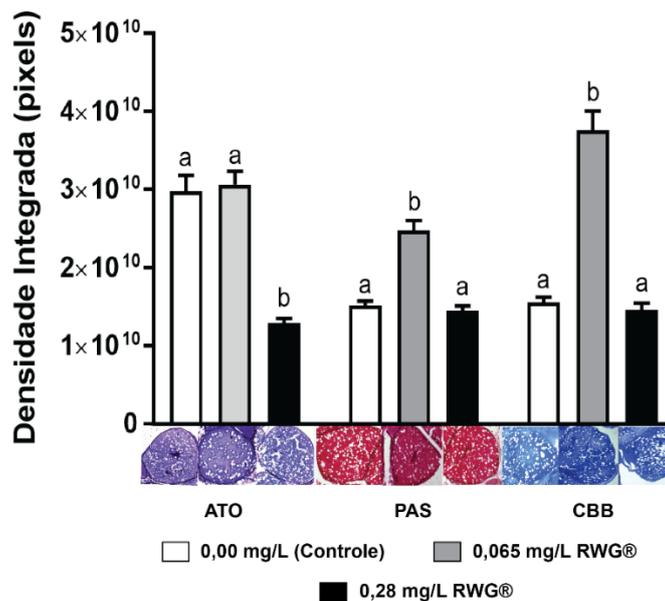
Média ± EPM da densidade integrada (pixels) do conteúdo de polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. Ausência de letras representa $p > 0,05$. ($n = 3$ fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). ATO = Azul de Toluidina, PAS = Ácido Periódico de Schiff, CBB = Azul Brilhante de Comassie. (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Figura 27: Efeito do RWG[®] sobre o conteúdo de polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OV de ovários de *M. potiuna*, após 14 dias de exposição.



Corte transversal de ovário de *M. potiuna*. Histoquímica dos OV (A, B e C) em ATO, (D, E e F) PAS e (G, H e I) CBB. Barra de escala: 50 μ m.

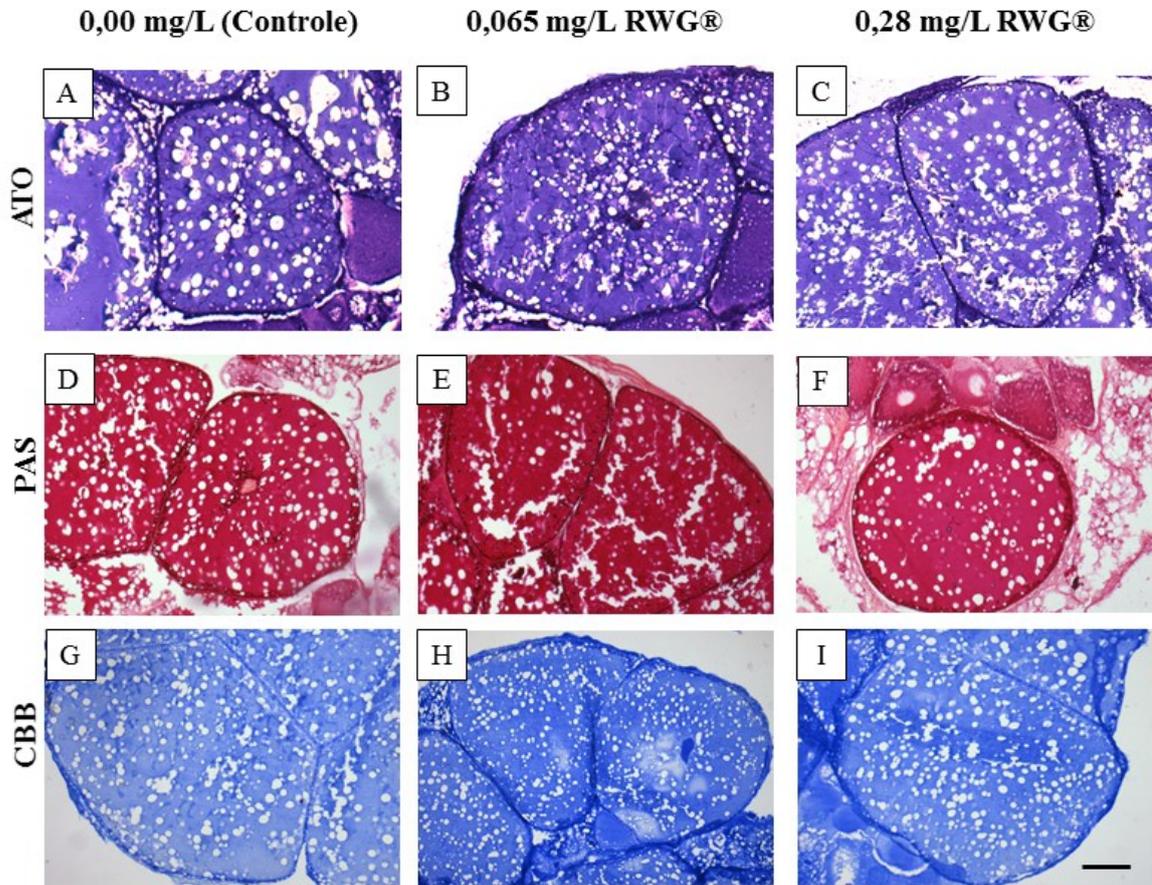
Figura 28: Densidade Integrada das reações positivas para polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais dos OM de ovários de *M. potiuna* após 14 dias de exposição ao RWG[®].



Média \pm EPM da densidade integrada (pixels) do conteúdo de polissacarídeos ácidos e neutros e proteínas totais. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n =

3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração). ATO = Azul de Toluidina, PAS = Ácido Periódico de Schiff, CBB = Azul Brilhante de Comassie. (Teste de Tukey HSD, $p < 0,05$).

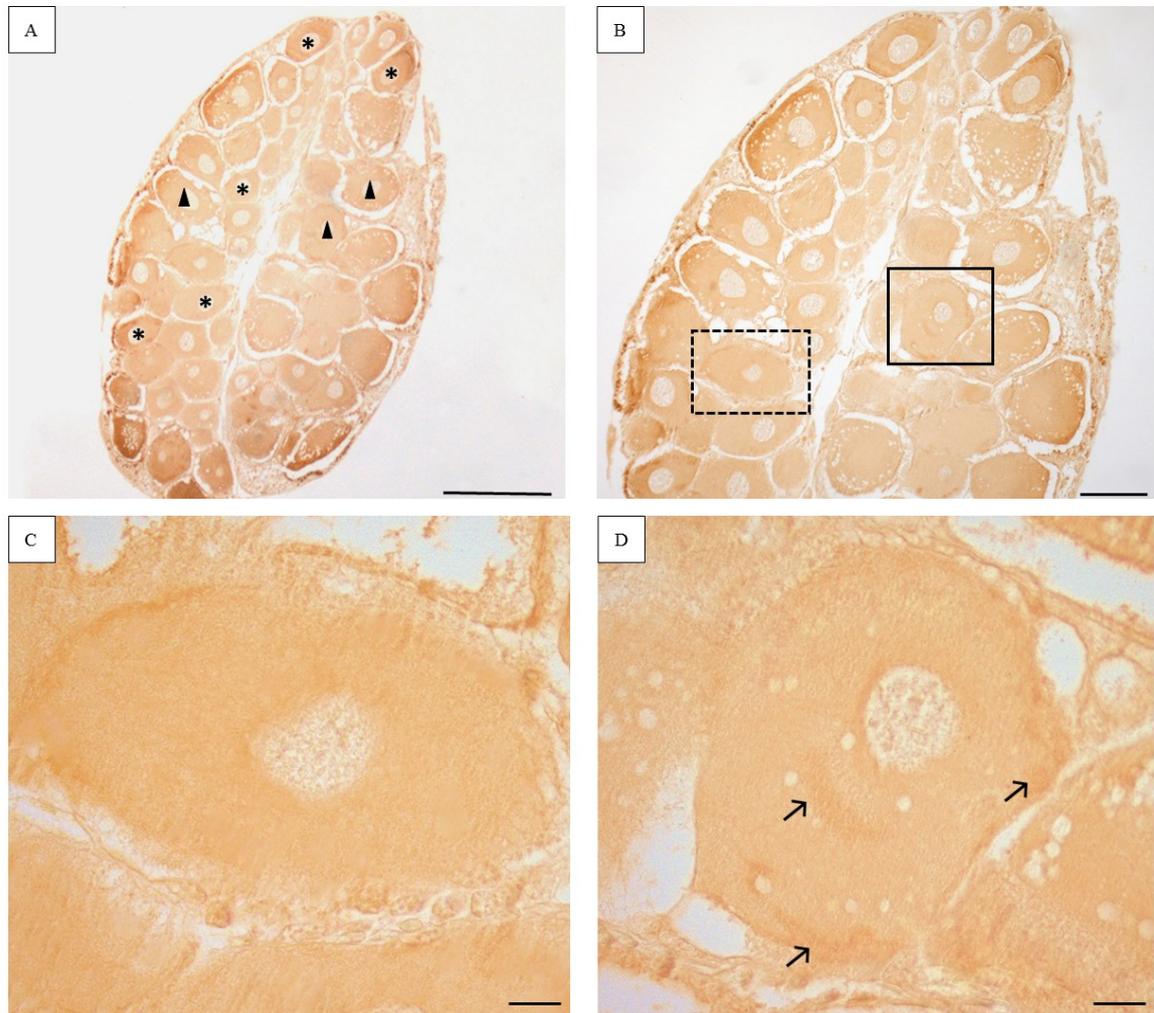
Figura 29: Efeito do RWG[®] sobre o conteúdo de polissacarídeos ácidos, neutros e proteínas totais dos OM de ovários de *M. potiuna*, após exposição por 14 dias.



Corte transversal de ovário de *M. potiuna*. Histoquímica dos OM (A, B e C) em ATO, (D, E e F) PAS e (G, H e I). Barra de escala: 200 μ m.

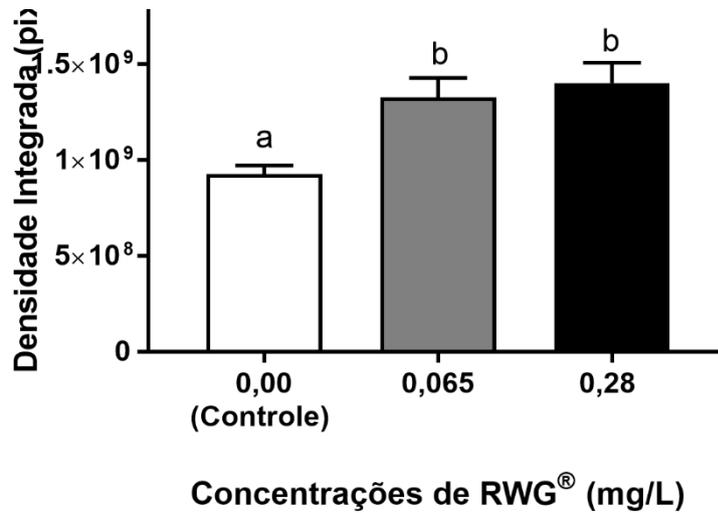
Na análise da marcação celular da proteína vitelina por imuno-histoquímica (Figura 30A, B), os OPV apresentaram uma imunorreação homogênea no citoplasma (Figura 30C), enquanto que os OV apresentaram uma reatividade mais intensa e aglomerados da proteína vitelina, primeiramente distribuídos na periferia e, à medida que a maturação avança, distribuídos por todo o citoplasma do ovócito (Figura 30D). Padrão observado tanto no grupo controle como nos grupos expostos a 0,065 mg/L e 0,28 mg/L RWG[®]. A quantificação da proteína vitelina nos OPV apresentou um aumento em ambas as concentrações de RWG[®] testadas, quando comparadas ao controle ($H = 18,25$, $p < 0,0001$) (Figura 31 e 33), similarmente ao que ocorreu em OV expostos a 0,065 mg/L RWG[®] ($H = 6,752$, $p < 0,0342$) (Figura 32 e 33).

Figura 30: Imunomarcção da proteína vitelina nas células germinativas do ovário de fêmeas de *M. potiuna* não expostas ao RWG®.



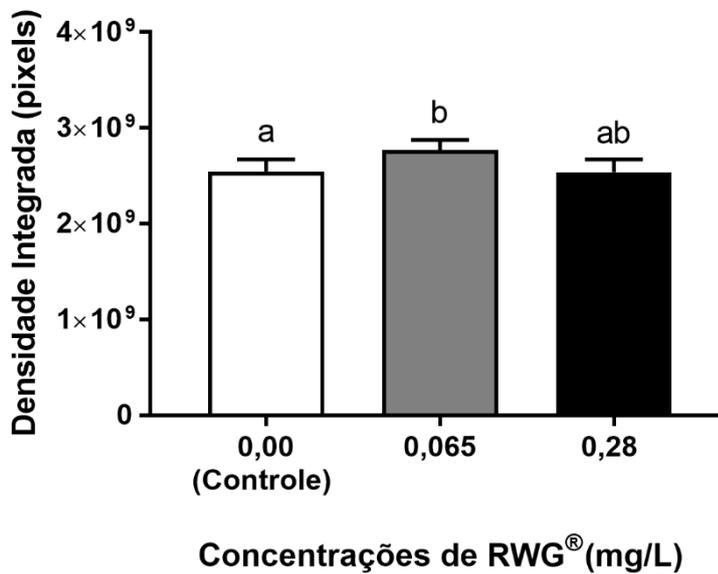
Corte transversal de ovário de *M. potiuna* não exposto ao RWG®. (A) Visão geral do ovário com OPV (asterisco) e OV (triângulo) positivos para a imunomarcção da proteína vitelina. (B) Quadros pretos representam ampliações dos OPV e OV positivos para a proteína vitelina apresentados em maior aumento em C e D, respectivamente. (C) OPV com imunorreção homogênea no citoplasma. (D) OV com aglomerados da proteína vitelina (seta preta) distribuídos no citoplasma. Barra de escala em A = 500 μm , B = 200 μm ; C e D = 50 μm .

Figura 31: Densidade Integrada das reações positivas para a proteínas vitelina em OPV de ovários de *M. potiuna* após 14 dias de exposição ao RWG[®].



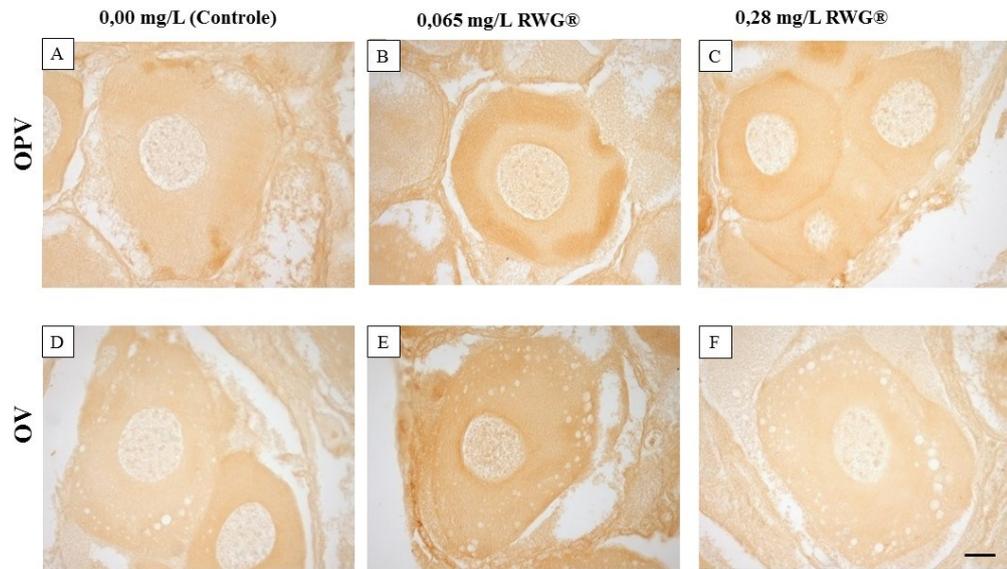
Média ± EPM da densidade integrada (pixels) do conteúdo da proteína vitelina em OPV. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração) (Teste de Tukey HSD, p < 0,05).

Figura 32: Densidade Integrada das reações positivas para a proteína vitelina em OV de ovários de *M. potiuna*, após 14 dias de exposição ao RWG[®].



Média ± EPM da densidade integrada (pixels) do conteúdo da proteína vitelina em OV. Letras do alfabeto romano diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos expostos por 14 dias. (n = 3 fêmeas/estágio da maturação ovariana/concentração) (Teste de Tukey HSD, p < 0,05).

Figura 33: Efeito do RWG[®] sobre a proteína vitelina dos OPV e OV de ovários de *M. potiuna*, após exposição por 14 dias.



Corte transversal de ovário de *M. potiuna*. Imunohistoquímica dos ovócitos pré-vitelogênicos- OPV (A, B e C) e ovócitos vitelogênicos- OV (D, E e F). Barra de escala: 50 µm.

5 DISCUSSÃO

O glifosato é reconhecido como o herbicida mais utilizado no mundo liderando o *ranking* de ingrediente ativo mais comercializado no Brasil (IBAMA, 2017). Diante deste cenário, é visível que estudos referentes a avaliação dos efeitos de formulações de HBG em organismos não-alvos aumentaram de maneira significativa nas últimas décadas. No presente trabalho, foram investigados os efeitos de uma formulação de HBG sobre a morfologia, morfometria e conteúdo de proteínas e carboidratos nas células germinativas do ovário da espécie endêmica do Brasil, *M. potiuna*.

As concentrações de HBG utilizadas no presente estudo estão de acordo com os valores estabelecidos pelo CONAMA e abaixo das concentrações já encontradas em águas superficiais no Brasil (0,02 – 2024 µg/L) e no mundo (1.600 µg/L; 0,10 a 0,70 mg/L; 28 e 45 µg/L) (Freire et al., 2012; Avigliano & Schenone, 2015; Peruzzo et al., 2008; Gunarathna et al., 2018). Após a exposição das fêmeas ao herbicida RWG[®] (0,065 mg/L e a 0,28 mg/L) por 14 dias, não foi encontrada diferença nas análises de biometria corporal, massa do ovário e IGS, quando comparadas ao grupo controle. Resultado semelhante foi obtido para fêmeas de caranguejo *N. granulata* expostas à concentração de 2,5 mg/L de HBG, Roundup Ultramax (Avigliano et al., 2014). Contudo, mesmo avaliando os valores ambientalmente relevantes para águas superficiais no país, observamos em nossos resultados efeitos danosos deste herbicida sobre a maturação ovariana do camarão de água doce *M. potiuna*.

O IGS é um parâmetro reprodutivo importante para estimar a condição reprodutiva, a partir das variações no crescimento das gônadas durante os ciclos reprodutivos, o que sem dúvida atribui uma referência importante a esta metodologia. Neste sentido, o IGS foi utilizado em inúmeros trabalhos sobre maturação ovariana, não só para palemonídeos (Carvalho 1981; Chaves & Magalhães, 1993; Mossolim & Bueno, 2002; Chang & Shih, 1995) como também para outros grupos de crustáceos (Avigliano et al., 2014; Canosa et al., 2018). Além disso, estudos acerca da toxicidade de HBG e de outros herbicidas, vêm utilizando o IGS para identificar possíveis alterações na maturação ovariana de crustáceos (Canosa et al., 2018; Silveyra et al., 2017, Negro & Collins, 2017) e peixes (Armiliato et al., 2014, Webster et al., 2014).

O fato de que em nossos resultados o IGS não ter sido comprometido pela ação do HBG sugere que ele representa uma avaliação criteriosa da capacidade reprodutiva para mensurar diferentes exposições a poluentes, pois baixas concentrações do herbicida, parecem não

interferir na massa corporal e ovariana de maneira a não comprometer o IGS. Embora o IGS seja um parâmetro relevante e uma ferramenta mensurável para estimar alterações na maturação ovariana, é importante que a avaliação toxicológica seja complementada através de análises estruturais e morfométricas do ovário.

As características externas dos ovários, utilizada por alguns autores como recurso para o reconhecimento do sexo e do período reprodutivo de paleomonídeos, bem como sua associação com a maturação das células germinativas, contribuem para o entendimento da biologia reprodutiva das espécies desta família de camarões (Zara et al., 2013; Braga et al., 2016). Assim, para continuar a inferir possíveis efeitos do RWG[®] sobre a maturação ovariana de *M. potiuna*, se fez necessário, primeiramente, caracterizar a estrutura morfológica dos ovários e de suas células germinativas.

Uma das características macroscópicas analisadas para o reconhecimento do estágio da maturação do ovário é a sua coloração, em virtude do acúmulo de carotenoides. Este pigmento desempenha um importante papel durante a embriogênese, como fonte de provitamina A e como antioxidantes. Em *M. potiuna*, assim como em *M. amazonicum* (Ventura et al., 2019) e *M. acanthurus* (Carvalho et al., 1981), à medida que os ovócitos amadurecem, os ovários apresentam acúmulo de carotenoides em sua superfície, dando-lhe a coloração esverdeada.

Outro parâmetro macroscópico avaliado no reconhecimento do estágio da maturação ovariana é a dimensão e a posição do ovário no cefalotórax, uma vez que o aumento no seu tamanho está relacionado a incorporação de proteínas e lipídios nos ovócitos (Cavali et al., 2001). Tais características morfológicas externas permitiram reconhecer três estágios da maturação dos ovários em *M. potiuna*, corroborando com a descrição macroscópica de ovários de *M. acanthurus* (Carvalho et al., 1981). Em *M. olfersi* (Mossolim & Bueno, 1993) e *M. rosenberguii* (Chang & Shih, 1995; Martins et al., 2007), a maturação do ovário foi estabelecida em 5 estágios e para *M. amazonicum* (Ventura et al., 2019) e *M. asperulum* (Huang et al., 2010) em seis estágios. Para evitar a perda de informações importantes na caracterização das principais etapas da maturação ovariana bem como aglutinar informações relevantes de um processo dinâmico, no presente estudo optou-se por categorizá-lo em estágio inicial, intermediário e avançado, os quais são facilmente reconhecidos em *M. potiuna*.

A observação microscópica dos ovócitos é considerada um dos métodos mais precisos para a determinação da maturidade ovariana (Carvalho et al., 1981; Ventura et al., 2019). A literatura apresenta diferentes classificações para as células germinativas do gênero *Macrobrachium* e, mesmo que não haja padronização na nomenclatura entre os autores, as

células germinativas podem ser categorizadas considerando parâmetros como diâmetro, visualização do núcleo e nucléolo, proporção núcleo/citoplasma e, distribuição de vesículas lipídicas e de grânulos de vitelo no citoplasma. Tais características, em conjunto com a descrição morfológica disponível na literatura (Carvalho, 1981; Chang & Shih, 1995; Chavez & Magalhães, 1993; Sooklang et al., 2012, Ventura et al., 2019), permitiram reconhecer e categorizar as células germinativas do ovário de *M. potiuna*, como: ovogônias, ovócitos pré-vitelogênicos I, ovócitos pré-vitelogênicos II, ovócitos vitelogênicos I, ovócitos vitelogênicos II e ovócitos maduros. Observou-se também que os ovócitos apresentam progressivo amadurecimento e deslocamento da região central para a periferia do ovário, sendo similar ao descrito para *M. acanthurus* (Carvalho et al., 1981) e *M. amazonicum* (Ventura et al., 2019), confirmando a uniformidade das características reprodutivas nas espécies deste gênero.

As Og, as menores células germinativas, foram observadas na região central do ovário, apresentando características como citoplasma escasso e alta atividade proliferativa, assim como demonstrado para outras espécies deste gênero (Massolim & Bueno, 2002; Huang et al., 2010). Contudo, essas características dificultam as análises morfológicas e morfométricas deste tipo celular.

Sooklang et al., (2012) relatam que em ovários de *M. rosenberguii* os OPV-I encontram-se próximos às Og e que a principal diferença entre OPV-I e II, é que este último apresenta uma menor relação núcleo/citoplasma, sendo seu diâmetro maior que os anteriores. Tais diferenças entre os OPV, demonstram o dinamismo da maturação dos ovários e, por este motivo, optamos por realizar análises morfométricas separadamente para ambos tipos celulares.

Em OPV- I e II de *M. amazonicum* há uma divergência de relatos quanto ao número de nucléolos, o que os autores justificam pela limitação da técnica histológica empregada, onde nem sempre é possível visualizar o núcleo e nucléolo (Chaves e Magalhães, 1993; Ventura et al., 2019). Em *M. potiuna* observamos a presença de apenas um nucléolo por OPV-I e II, assim como descrito também para *M. rosenberguii* (Sooklang et al., 2012) e *M. asperulum* (Huang et al., 2010).

De acordo com a literatura, o aumento no tamanho dos OPV pela deposição de lipídios na periferia do citoplasma constitui indícios da formação dos OV (Carvalho, 1981; Chaves & Magalhães, 1993, Ventura et al., 2019), o que facilita seu reconhecimento em meio as demais células germinativas do ovário. Os mesmos autores descrevem que a medida que os OV avançam no processo de maturação, há o preenchimento do citoplasma por vesículas lipídicas e proteínas o que dificulta a observação do núcleo, caracterizando assim, o OM.

Características morfológicas semelhantes às descritas acima, para células germinativas do ovário do gênero *Marcrobrachium*, foram evidenciadas tanto no grupo exposto ao RWG® como no grupo controle, sendo possível sugerir que as concentrações utilizadas neste estudo, parecem não comprometer o padrão morfológico e sua organização. Contudo, em ovários de *N. granulata* em rematuração, foi observado um aumento no número de ovócitos em reabsorção quando expostas a 2,5 e 5 mg/L de glifosato puro (Avigliano et al., 2014). Visto que, neste estudo foi utilizado uma formulação comercial onde os “ingredientes inertes” presentes na mesma, podem ter atuado como antagonistas ao efeito do glifosato puro. Mesmo não tendo evidenciado alterações morfológicas, não pode ser descartado que alterações bioquímicas e moleculares possam ter ocorrido, sendo necessário desenvolver mais estudos para continuar a elucidar o efeito deste herbicida nos ovários de *M. potiuna*.

Conforme ocorre o avanço da maturação ovariana, as células germinativas apresentam diferenças no tamanho devido a incorporação dos compostos orgânicos. Assim, através da análise morfométrica é possível acompanhar o processo da maturação ovariana (Carvalho et al., 1981, Ventura et al., 2019), permitindo observar também, possíveis alterações no tamanho dos ovócitos quando expostos a um poluente (Canosa et al., 2018; Silveyra et al., 2018, Negro & Collins, 2017; Avigliano et al., 2014). As morfometrias realizadas neste estudo demonstraram que a Classe I de IGS foi menos prejudicada quando comparada às demais classes. Tal observação pode estar relacionada com o estágio da maturação das células germinativas destes ovários, uma vez que a Classe I difere das demais, por apresentar maior número de ovócitos em estágio inicial da vitelogênese, sugerindo que fêmeas expostas no início da maturação, podem estar acumulando danos que irão comprometer as etapas subsequentes deste processo. Embora a organização em classes de IGS facilite a compreensão do período reprodutivo das espécies, trabalhos de toxicidade em ovários, consideram os efeitos dos poluentes apenas nas células germinativas, faltando indicar em qual estágio da maturação as fêmeas se encontram.

A exposição a herbicidas pode reduzir o tamanho dos ovócitos em crustáceos, conforme observado nos caranguejos *Chasmagnathus granulata*, *N. granulata* (Rodríguez et al., 1994, Silveyra et al., 2017), o que pode estar relacionado com a diminuição das reservas energéticas, como os carboidratos. No entanto, no presente estudo, observamos o aumento do tamanho dos OPV e OV, sendo concomitante ao aumento do conteúdo de proteínas totais e carboidratos ácidos e neutros. Assim, ambos resultados sugerem que a síntese e incorporação destas macromoléculas foi estimulada pela exposição ao HBG, refutando a hipótese de que o herbicida diminuiria o comprimento das células germinativas. Tal aumento na morfometria também foi

evidenciada em ovócitos do caranguejo *N. granulata* expostos a uma formulação de Roundup e em OPV de *D. rerio* expostos à mesma concentração de RWG[®], utilizada neste estudo (0,065 mg/L) (Armiliato et al., 2014).

Outros estudos também demonstraram um aumento no tamanho dos ovócitos em espécies de crustáceos expostos a inseticidas, como no caranguejo *Gecarcoidea natalis* exposto ao piriproxifeno (Linton et al., 2009) e no caranguejo de água doce *Zilchiopsis collastinensis* exposto ao endosulfan e clorpirifós (Negro, 2015; Negro & Collins, 2017). Dentre os ovócitos com alterações na morfometria, as ocorridas nos OPV foram as mais evidenciadas por estes autores, indo de encontro com nossos resultados. Estas células são responsáveis pela síntese de RNAs mensageiros que codificam receptores e enzimas envolvidas no processo proteolítico da vitelogenina em vitelina no ovário, processo importante para as etapas seguintes da vitelogênese. Neste contexto, tais análises sugerem uma maior sensibilidade deste tipo de ovócito, quando exposto a poluentes.

A maturação ovariana pode ser alvo da desregulação endócrina por substâncias químicas capazes de atuar mimetizando hormônios, bloqueando receptores e/ou inibidores de enzimas (Linton et al., 2009). Avigliano et al., (2014) sugerem que o aumento dos ovócitos pode estar relacionado a ação de desregulador endócrino do glifosato, sobre hormônios envolvidos na maturação ovariana. Assim, considerando o HBG como um desregulador endócrino para *M. potiuna* (Melo et al., 2019b), uma possibilidade, é que este herbicida poderia estar potencializando a ação do hormônio estimulador da gônada e atuando de modo contrário, no hormônio inibidor da gônada, levando a aceleração da maturação ovariana. Porém, mais estudos são necessários para compreender este aumento no comprimento dos eixos das células germinativas de *M. potiuna* quando expostas ao HBG.

A aceleração da maturação ovariana e o consequente aumento das reservas energéticas, pode ser capaz de provocar a desova fora da estação reprodutiva normal, além de causar efeitos no processamento das macromoléculas constituintes do vitelo, como na clivagem e síntese de proteínas (Linton et al., 2009). Um possível comprometimento da qualidade das reservas energéticas, poderia interferir no desenvolvimento embrionário, o que diminuiria o desempenho reprodutivo de *M. potiuna*. Cabe ressaltar ainda, que não há dados anteriores ao presente estudo avaliando os efeitos de diferentes concentrações de HBG sobre a morfologia e morfometria de células germinativas de espécies de crustáceos endêmicas do Brasil.

Ao analisarmos a morfometria dos ovócitos presentes em ovários da Classe III de IGS após a exposição ao HBG, nossos resultados mostraram uma redução do comprimento dos eixos

dos ovócitos OPV e OV, assim como dos núcleos. Fêmeas em classes mais avançadas do IGS, apresentam grande parte do ovário preenchidos por ovócitos maduros, além de destinarem parte de suas reservas energéticas para etapas subsequentes da reprodução (Chang & Shih, 1995). Assim, como um mecanismo compensatório e uma estratégia reprodutiva, as fêmeas expostas ao HBG podem ter reduzido o metabolismo celular e a demanda energética da maturação dos OPV-I, II e OV neste estágio da maturação, para garantir a energia necessária para os processos seguintes da reprodução, como eclosão, fecundação e transporte dos embriões na câmara incubadora.

Além disso, uma provável explicação para a ausência de diferença no tamanho dos eixos dos OM expostos ao RWG[®], pode estar relacionada ao aumento na quantidade de carotenoides durante a fase mais avançada da maturação ovariana. No ovário, este pigmento possui ação antioxidante, um importante mecanismo na proteção dos ovócitos contra um possível estresse oxidativo causado pela exposição a agentes externos, como os agrotóxicos (Liñán et al., 2002). Desta maneira, os carotenoides parecem auxiliar na continuidade da maturação ovariana em fêmeas expostas ao HBG em estágios mais avançados, evitando o declínio da população deste crustáceo de água doce. Assim, a organização em Classes, foi fundamental para a obtenção destes resultados, visto que eles podem estar relacionados a fase de maturação em que estes ovários se encontram. Embora a morfometria seja uma metodologia aplicada tanto para a categorização das células germinativas (Carvalho et al., 1981) quanto para inferir possíveis efeitos de poluentes (Canosa et al., 2018), é importante que seja acompanhada por outras metodologias para confirmação dos resultados, como análises ultraestruturais.

Para determinar a composição das moléculas orgânicas utilizadas durante a dinâmica da maturação ovariana, o uso de técnicas histoquímicas tem sido empregado (Braga et al., 2016). Nos crustáceos, os ovários são considerados um importante órgão de armazenamento de nutrientes orgânicos na forma de proteínas, lipídios e carboidratos, depositados na gônada durante a maturação e utilizados como fonte de energia pelos embriões em desenvolvimento (Chag & Shih, 1995). Porém, quando submetidos a uma situação de estresse, como a exposição a um poluente, a síntese e deposição destes compostos no ovário podem apresentar flutuações (Vijayavel & Balasubramanian, 2006).

Em crustáceos decápodes, estudos demonstram que, à medida que a maturação avança, ocorre um aumento no conteúdo de proteínas totais e polissacarídeos ácidos. Porém, OM apresentam reatividade baixa ou negativa para polissacarídeos ácidos (Nicolau et al., 2011; Zara et al., 2013). Uma vez que em nossos resultados, as concentrações de RWG[®] aumentaram o

conteúdo de proteínas e carboidratos nos OPV e OV e, reduziram o conteúdo de polissacarídeos ácidos em OM, podemos sugerir que as fêmeas, para atender as demandas energéticas necessárias para desintoxicar, minimizar o estresse da exposição ao RWG[®] e garantir a reprodução, aumentaram a síntese destes compostos orgânicos.

Tendo em vista os resultados referentes ao aumento no conteúdo das proteínas e carboidratos nos OPV e OV de fêmeas de *M. potiuna* expostas ao RWG[®], analisamos também, o conteúdo da proteína vitelina nestas células. A vitelogenina, molécula precursora da vitelina, é sintetizada no hepatopâncreas, liberada na hemolinfa e captada por endocitose pelo ovário onde é modificada em vitelina pela adição de polissacarídeos e lipídios (Charniaux-Cotton, 1985, Sagi et al., 1995). A vitelina é uma lipoglicoproteína, que contém os constituintes necessários para a embriogênese e a sobrevivência dos embriões (Subramoniam, 2011). Portanto, a qualidade e quantidade de vitelina acumulada nos ovócitos são fundamentais para o sucesso reprodutivo das espécies. Nossos resultados mostraram que, após a exposição ao RWG[®], os OPV e OV aumentaram o conteúdo da proteína vitelina, ao mesmo tempo que aumentaram as proteínas totais, carboidratos e lipídios, demonstrando assim, que nossa hipótese inicial, de que tanto a vitelina quanto os compostos orgânicos diminuiriam, foi rejeitada.

O HBG também foi capaz de estimular o crescimento e a maturação ovariana no caranguejo *N. granulata*, indicando um provável aumento da síntese de vitelogenina e sua deposição e modificação em vitelina nas células germinativas do ovário (Avigliano et al., 2014). Uma possibilidade para explicar tais aumentos, como já mencionado anteriormente, é a interferência do HBG no sistema endócrino de fêmeas de *M. potiuna*, considerando o fato de que Melo, et al., (2019b) descrevem um aumento da 20-hidroxiecdisona nesta espécie de crustáceo exposta ao RWG[®] e que este ecdisteróide também estimula a vitelogênese durante a maturação dos ovócitos, através da indução da síntese de Vg (Hyne 2011).

A partir do presente estudo, sugere-se que o aumento no comprimento dos eixos dos ovócitos, pode estar relacionado ao aumento do conteúdo dos carboidratos e das proteínas totais, bem como da proteína vitelina. Neste contexto, a exposição ao HBG, mesmo nas concentrações regulamentadas pelo CONAMA, pode estimular a maturação ovariana, o que poderá comprometer a curto e longo prazo a reprodução dos crustáceos de água doce. Assim, investigações nos compartimentos subcelulares das células germinativas e na expressão de genes envolvidos na captação e clivagem da vitelogenina no ovário para a avaliação da toxicidade de HBG, podem ser de grande valor para entender melhor as respostas obtidas neste estudo.

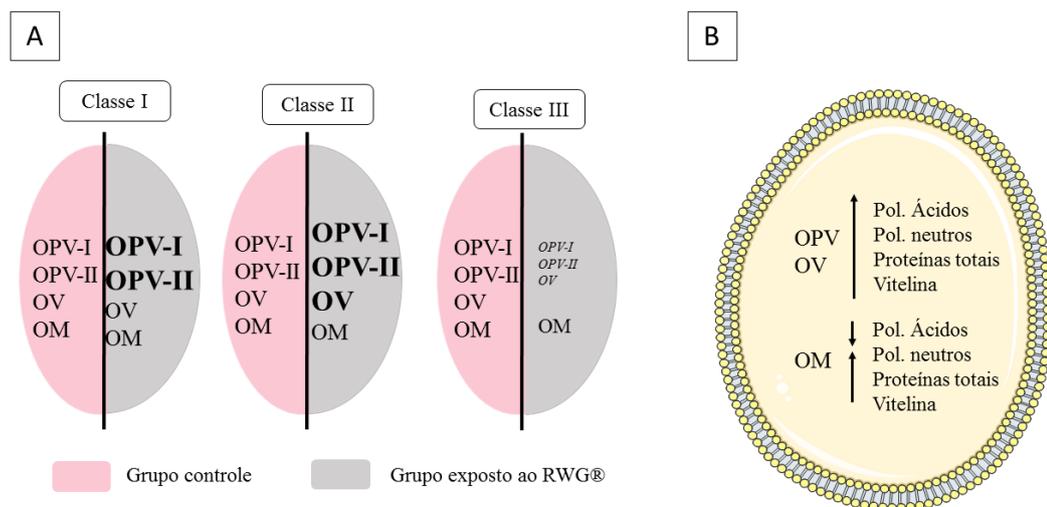
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a compreensão da organização estrutural dos ovários de *M. potiuna*, o que permitiu reconhecer os efeitos da exposição ao herbicida Roundup WG® na gônada deste camarão de água doce, endêmico da fauna brasileira. Assim, podemos concluir que:

Os ovários expostos à concentração de 0,065 mg/L e 0,28 mg/L de RWG® por 14 dias, não apresentaram alterações na organização estrutural macro e microscópica. Na biometria corporal e nos ovários das fêmeas expostas por 14 dias a estas concentrações de RWG®, não foram observadas diferenças e, em consequência, não ocorreram alterações no IGS.

Houve um aumento no tamanho dos OPV e OV nos ovários das fêmeas expostas no estágio inicial da maturação e uma redução destas células no estágio mais avançado, o que indica que o RWG® compromete a maturação ovariana. Estes efeitos, em conjunto com o aumento do conteúdo de polissacarídeos ácidos, neutros, proteínas totais e da proteína vitelina nos ovários de fêmeas de *M. potiuna* expostas ao herbicida, podem indicar uma aceleração na maturação ovariana, que pode ter sido ocasionada por uma possível atuação do herbicida RWG® como um desregulador endócrino (Figura 33).

Figura 34: Resumo gráfico dos efeitos da exposição de fêmeas de *M. potiuna*, durante a maturação ovariana, ao RWG®.



(A) Representação esquemática dos ovócitos por classe de IGS, após a exposição ao RWG® por 14 dias. (B) Representação dos resultados da quantificação dos polissacarídeos ácidos e neutros, proteínas totais e da proteína vitelina em OPV (ovócitos pré-vitelogênicos), OV (ovócitos vitelogênicos) e OM (ovócitos maduros), após a exposição ao RWG® por 14 dias.

7 REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*, v. 25, n.4, p. 589-593, 2002.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Anvisa irá reavaliar glifosato e outros quatro agrotóxicos utilizados no país, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 28 de julho de 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Nota Técnica Nº 23/2018 Apresenta a nota técnica preliminar sobre as conclusões da reavaliação do glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida a consulta pública p. 1-10.
- AKCHA, F.; SPAGNOL, C.; ROUXEL, J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, p. 104-113, 2012.
- ARMILIATO, N.; AMMAR, D.; NEZZI, L.; STRALIOTTO, M.; MULLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. *Journal Toxicology. Environmental Health*, v. 77, p. 405-14, 2014.
- AVIGLIANO, L.; ALVAREZ, N.; LOUGHLIN, C. M. A. C; RODRÍGUEZ, E. M. Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching, and ovarian rematuration in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, n. 8, p. 1879-1884, 2014.
- AVIGLIANO, E.; SCHENONE, N. F. Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fecal coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). *Microchemical Journal*, v. 122, p.149-158, 2015.
- BANAEAA, M. M. A.; SOLTANIANB, S.; GHOLAMHOSSEINIB, HEIDARIEHB, A. H.; FERREIDOUNIB, M. S. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 222, p. 145-155, 2019.

- BARBOSA, A. M. C.; SOLANO, M. L. M.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Drinking Water- The Brazilian Monitoring Program. *Frontiers in Public Health*, v. 3, p. 110, 2015.
- BEDNÁŘOVÁ, A.; KROPF, M.; KRISHNAN, N. The surfactant polyethoxylated tallowamine (POEA) reduces lifespan and inhibits fecundity in *Drosophila melanogaster*- In vivo and in vitro study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 188, p.109883, 2020.
- BENTES, B.; MARTINELLI-LEMO, J. M.; LUTZ, Í. A. F.; NASCIMENTO, M. S.; ISAAC, V. J. Population dynamics of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda: Palaemonidae) in a Brazilian Amazon estuary. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2016.
- BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. O ciclo reprodutor de *Macrobrachium borelli* e *Macrobrachium potiuna* e suas relações com a temperatura. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 43, p. 473-483, 1982.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de zoologia*, v. 49, n. 4, p. 883-96, 1989.
- BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. BRAGA, A. A.; NUNESA, E. T.; LÓPEZ-GRECCOB, L. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FRANSOZO, V. Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). *Micron*, v. 88, p. 60-67, 2016.
- BRAGA, A. A.; NUNESA, E. T.; LÓPEZ-GRECCOB, L. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FRANSOZO, V. Histological and histochemical features of the oogenesis in the simultaneous protandric hermaphrodite shrimp *Exhippolysmata oplophoroides* (Decapoda: Caridea). *Micron*, v. 88, p. 60-67, 2016.
- BRASIL, Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília, de 11 de julho de 1989. 60 p.
- BRASIL, Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições

- e padrões de lançamento de efluentes e, dá outras providências. Diário Oficial da União 66, p. 66-68.
- CANOSA, I. S.; SILVEYRA, G. R.; AVIGLIANO, L.; MEDESANI, D. A.; RODRÍGUEZ, E. M. Ovarian growth impairment after chronic exposure to Roundup Ultramax® in the estuarine crab *Neohelice granulata*. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 2, p. 1568-1575, 2018.
- CANOSA, I. S.; ZANITTIA, M.; LONNÉA, N.; MEDESANIA, D. A.; RODRÍGUEZ, E. M. Imbalances in the male reproductive function of the estuarine crab *Neohelice granulata*, caused by glyphosate. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 182, p. 109-405, 2019.
- CARVALHO, H. A. Morfologia do aparelho reprodutor de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) Parte II: Feminino. Tropical Oceanography, v. 16. p. 249-264, 1981.
- CARVALHO, F. L.; PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Molecular data raise the possibility of cryptic species in the Brazilian endemic prawn *Macrobrachium potiuna* (Decapoda, Palaemonidae). Latin American Journal of Aquatic Research, v. 41, p. 707-717, 2013.
- CAVALLI, R. O.; TAMTIN, M.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* de Man/ females during maturation. Aquaculture, v. 193, p. 311-324, 2001.
- CHANG, C. F.; SHIH, T. W. Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Invertebrate Reproduction and Development, v. 27, n. 1, p. 11-20, 1995.
- CHARNIAUX-COTTON, H.; Vitelogenesis and Its Control in Malacostracan Crustacea. American Zoologist, v. 25, p. 197-206, 1985.
- CHAVES P. T. C.; MAGALHÃES. C. O desenvolvimento ovocitário em *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), camarão dulcícola da região amazônica. Acta Amazonica, v. 23, n. 1, p. 17-23, 1993.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA) - Resolução nº 357. Classificação corpos d'água. Diário Oficial da União, p. 58-63, 2005.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismos de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 15, p. 65-72, 2005.

- CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; BØHN, T. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, v. 22, p. 251-262, 2013.
- DUKE, O. S.; POWLES, S. B. Opioid analgesic-treated chronic pain patients at risk for problematic use. *American Journal of Managed Care*, v. 19, n. 11, p. 871-880, 2008.
- DUTRA, B. K.; FERNANDES, F. A.; FAILACE, D. M.; OLIVEIRA, G. T.; Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*, v. 20, p. 255-263, 2011.
- FENG, J. C.; THOMPSON, D. G.; REYNOLDS, P. E. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1110-1118, 1990.
- FOLMAR, L.; SANDERS, H.; JULIN, A. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 8, p. 269-278, 1979.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food and agriculture, p. 1-182, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food and agriculture leveraging food systems for inclusive rural transformation, p. 1-181, 2017.
- FREIRE, R.; SCHNEIDER, R. M.; FREITAS, F. H.; BONIFÁCIO, C. M.; TAVARES, C. R. G. Monitoring of toxic chemical in the basin of Maringá stream. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 34, n. 3, p. 295-302, 2012.
- FRONTERA, J. L.; VATNICK, I.; CHAULET, A.; RODRÍGUEZ, E. M. Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 61, n. 4, p. 590-598, 2011.
- FUMETTI, S. VON; BLAUROCK, K. Effects of the herbicide Roundup® on the metabolic activity of *Gammarus fossarum* Koch, 1836 (Crustacea; Amphipoda). *Ecotoxicology*, v. 27, n. 9, p. 1249-1260, 2018.
- GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Monsanto, p. 66, 2005.

- GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 167, p. 35-120, 2000.
- GUNARATHNA, S.; GUNAWARDANA, B.; JAYAWEERA, M.; ZOYSA, K. Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 53, p. 1-9, 2018.
- GUYTON, K. Z. LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM- TALLAA, L.; GUHA, N.; ZEISE, L. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet oncology*, v. 16, n.5, p. 490-491, 2015.
- HANK, I.; WITTMER, I.; BISCHOFBERGER, S.; STAMM, C.; SINGER, H. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, v. 81, p. 422-429, 2010.
- HYNE, R. V.; Revisão da biologia reprodutiva de anfípodas e sua regulação endócrina: identificação de vias mecanicistas de toxicidade reprodutiva. *Environ Toxicol Chem*, v. 30, p. 2647-2657, 2011.
- HOLTHUIS, L. B. A General Revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. 11. The Subfamily Palaemoninae. Allan Hancock Found. Occasional Paper, v. 12, p. 1-396, 1952.
- HONG, Y.; YANG, X.; HUANG, Y.; YAN, G.; CHENG, Y. Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. *Chemosphere*, v. 210, p. 896-906, 2018.
- HONG, Y.; HUANG, Y.; YAN, G.; PAN, C.; ZHANG, J. Antioxidative status, immunological responses, and heat shock protein expression in hepatopancreas of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* under the exposure of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol*, v. 86, p. 840-845, 2019.
- HUANG, K. H.; WU, J. P.; WANG, S. Y.; HUANG, D. J.; CHEN, H. C. Ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium asperulum* (decapoda: palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*. v. 30, n. 4, p. 615-623, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 30 de janeiro de 2019.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Ed: Estudos e Pesquisas. Informação Geográfica número 10, Rio de Janeiro. p. 348, 2015.
- JANSSENS, L. & STOKS, R. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. *Aquatic Toxicology*, v. 193, p. 210-216, 2017.
- JARAMILLO, M. L.; PEREIRA, A. G.; DAVICO, C. E. NEZZI, L.; AMMAR, D.; MULLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup. *Animal: an international journal of animal bioscience*, v. 12, n. 7. p. 1424-1434, 2018.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, v. 18, p. 260-267, 2003.
- KOMIVES. T.; SCHRÖDER, P. On glyphosate. *Ecocycles*, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2016.
- KOMM, B. S.; GERTRUDE W. H.; Oogenesis in the Terrestrial Hermit Crab, *Coenobita clypeatus* (Decapoda, Anomura): II. Vitellogenesis. *Journal of morphology*. v. 192, p. 269-277, 1987.
- KROLL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive components Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod Crustacea. v.10, 1992.
- LASRAM, M. M.; DHOUIB, I. B.; ANNABI, A.; EL FAZAA, S.; GHARBI, N. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology*. v. 322, p. 1-13, 2014.
- LEE, F. Y.; CHANG, C. F.; The Concentrations of Vitellogenin (Vitellin) and Protein in Hemolymph, Ovary and Hepatopancreas in Different Ovarian Stages of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 117, n. 4, p. 433-439, 1997.
- LEI MUNICIPAL Nº 4605 CRIA O PARQUE MUNICIPAL DO MACIÇO DA COSTEIRA E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a/sc/f/florianopolis/lei-ordinaria/1995/460/4605/lei-ordinaria-n-4605-1995-cria-0-parque-municipal-do-macico-da-costeira-e-da-outras-providencias>. Acesso em 01 de novembro de 2019.

- LIÑÁN-CABELLO, M. A.; PANIAGUA-MICHEL, J.; HOPKINS, P. M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, v. 8, p. 299-309, 2002.
- LINTON, S.; BARROW, L.; DAVIES, C.; HARMAN, L. Potential endocrine disruption of ovary synthesis in the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* by the insecticide pyriproxyfen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 154, p. 289-297, 2009.
- LÓPEZ, A. M. C.; SARMENTO, R. A.; SARAIVA, A. S.; PEREIRA, R. R.; SOARES, A. M. V. M.; PESTANA, J. L.T. Exposure to Roundup® affects behaviour, head regeneration and reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. *Science of the Total Environment*, v. 675, p. 453-461, 2019.
- LUMMATO, M. M.; SABATINIB, S. E. L. C. C.; COCHÓNA, A. C.; CATALDOD, D.; MOLINAA, M. C. R.; JUÁREZA, Á. B. Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 163, p. 69-75, 2018.
- MACIEL, C. R.; VALENTI, W. C. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review. *Nauplius*, v. 17, n. 2, p. 61-79, 2009.
- MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion- exchange solid-phase extraction columns flowed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 823, n. 1, p. 129-136, 1998.
- MARTINS, J.; RIBEIRO, K.; RANGEL-FIGUEIREDO, T.; COIMBRA. J. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, v. 27, p. 220-228, 2007.
- MASKEY, E.; CROTTYA, H; WOOTENA, T.; KHANA, I. A. Disruption of oocyte maturation by selected environmental chemicals in zebrafish. *Toxicology in Vitro*, v. 54, p. 123-129, 2019.
- MATOZZO, V.; FABRELLO, J.; MASIERO, L.; FERRACCIOLI, F.; FINOS, L.; PASTORE, P.; DI GANGI, I. M.; BOGIALLI, S. Ecotoxicological risk assessment for the herbicide GLYPHOSATE to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, v. 233, p. 623-632, 2018.
- MATTOS, L. A. DE; OSHIRO, L. M. Y. Estrutura populacional de *Macrobrachium potiuna* (Crustacea, Palaemonidae) no Rio do Moinho, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 9, n. 1, p. 81-86, 2009.

- MILAN, M.; ROVERE, G. D.; SMITS, M.; FERRARESSO, S.; PASTORE, P.; MARIN, M. G.; BOGIALLI S.; PATARNELLO, T.; BARGELLONI, L.; MATOZZO, V. Ecotoxicological effects of the herbicide glyphosate in non-target aquatic species: Transcriptional responses in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, v. 237, p. 442-451, 2018.
- MELO, M. S.; SANTOS, T. P. G. D.; JARAMILLO, M.; NEZZI, L.; MULLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Histopathological and ultrastructural indices for the assessment of glyphosate-based herbicide cytotoxicity in decapod crustacean hepatopancreas. *Aquatic Toxicology*, v. 210, p. 207-214, 2019a.
- MELO, M. S.; NAZARI, E. M. N.; JOAQUIM-JUSTO, C.; MÜLLER, Y. M. R.; GISMONDI, E. Effects of low glyphosate-based herbicide concentrations on endocrine-related gene expression in the decapoda *Macrobrachium potiuna*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, p. 21535-21545, 2019b.
- MELO, M. S.; NAZARI, E. M. N.; JOAQUIM-JUSTO, C.; MÜLLER, Y. M. R.; GISMONDI, E. Modulação de expressões gênicas antioxidantes pela exposição Roundup® no decápode *Macrobrachium potiuna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 190, p. 110086, 2020.
- MENSAH, P. K.; MULLER, W. J.; PALMER, C. G. Acute toxicity of Roundup® herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 36, n. 14-15, p. 905-909, 2012.
- MENSAH, P. K.; PALMER, G. C.; MULLER, W. J. Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: The case of a freshwater shrimp exposure to Roundup®. *Pesticides - Toxic Aspects*, p. 166-185, 2014.
- MONTAGNA, M. C.; COLLINS P. A. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 371-378. 2007.
- MORENO, N.C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C.B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, p. 448-454, 2014.
- MOSSOLIM, E. C.; BUENO, S. L. S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, v. 22, n. 2, p. 367-376, 2002.

- MOTTIER, A.; SÉGUIN, A.; DEVOS, A.; PABIC, C. L.; VOISEUX, C.; LEBEL, J. M.; SERPERTINI, A.; FIEVET, B.; COSTIL, K. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Marine Pollution Bulletin*, v. 95, n. 2, p. 665-677, 2015.
- MÜLLER, Y.; AMMAR, D.; NAZARI, E. Embry development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 1975, p. 27-32, 2004.
- MÜLLER, Y. M. R.; CARPES S. L. *Macrobrachium potiuna* (Müller): Aspectos do ciclo reprodutivo e sua relação com parâmetros ambientais (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 8, p. 23-30, 1991.
- MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; AMMAR, D.; CARGNIN FERREIRA, E.; BELTRAME, I. T.; PACHECO, C. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, n. 3, p. 629-36, 1999.
- NAVARRO-MARTÍNA, L.; LANCTÔTA, C.; JACKMANB, P.; PARKC, B. J.; DOEB, K.; PAULID, B. D.; TRUDEAUAA, V. L. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquatic Toxicology*, v. 154, p. 278-290, 2014.
- NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; DIAS, M. Comparisons of Fecundity, Egg Size, and Egg Mass Volume of the Freshwater Prawns *Macrobrachium Potiuna* and *Macrobrachium Olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, v. 23, n. 4, p. 862-868, 2003.
- NEGRO, C. L.; COLLINS, P. Histopathological effects of chlorpyrifos on the gills, hepatopancreas and gonads of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis*. Persistent effects after. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 140, p. 116-122, 2017.
- NEGRO, C. L. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 113, p. 87-94, 2015.
- NICOLAU, C. F.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO-SANTOS, C.; ARMANDO, S. OSHIRO, L. M. Y. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica (Stockholm)*, v. 93, p. 222-230, 2012.

- O'DONOVAN, P.; ABRAHAM, M.; COHEN, D. The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous. *Science*, v. 36, p. 347-358, 1984.
- OLIVEIRA, F. G.; LIROLA J. R.; SALGADO, L. D.; MARCHI, G. H.; MELA, M.; PADIAL, A. A.; GUIMARÃES, A. T. B.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. *Science of the Total Environment*, v. 667, p. 371-383, 2019.
- PEREIRA, A. G.; JARAMILLO, M. L.; REMOR, A. P.; LATINI, A.; DAVICO, C. E.; DA SILVA, M. L.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. *Chemosphere*, v. 209, p. 353-362, 2018.
- PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, v. 156, p. 61-66, 2008.
- PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: *Herbicides and environment: IntechOpen*, p. 29, 2011.
- PRATA, F.; LAVORENT, A.; REGITANO, J. B.; VERECKEN, H.; TORNISIELO, V. L.; PELISSARI, A. Glyphosate behavior in a Rhodic Oxisol under no-till and conventional agricultural systems. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, v. 29, p. 61-69, 2005.
- REBELO, R. M.; VASCONCELOS, R. A.; BUYS, B. D. M. C.; REZENDE, J. A.; MORAES, K. O. C.; OLIVEIRA, R.P. *Produtos agrotóxicos e afins produzidos em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental*, 2010.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Caderno de Saúde Pública*, v. 30, p. 1-3, 2014.
- RODRIGUEZ, E. M.; SCHULDT, M.; ROMANO, L. Chronic histopathological effects of parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Food and Chemical Toxicology*, v. 32, p. 811-818, 1994.
- SAGI, A.; SOROKA, Y. E.; SNIR, V. O.; CHOMSKY, R.; CALDERON, J.; MILNER, Y. Ovarian protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Does ovarian vitellin synthesis exist? *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 27, n. 1, p. 41-47, 1995.
- SILVEIRA, T.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; DOMINGUES, W. B.; SANTOS, M.; REMIÃO, L.; BARRETO, B.; LESSA, I.; MARTINS, D.; BOYLE, R. T.; COSTA, P.

- G.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R. B.; CAMPOS, V. F. Roundup® herbicide decreases quality parameters of spermatozoa of silversides *Odontesthes humensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 102, p. 1-6, 2019.
- SILVEYRA, G. R.; SILVEYRA, P.; VATNICKC, I.; MEDESANIA, D. A.; RODRÍGUEZ, E. M. Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkia*. *Aquatic Toxicology*, v. 197, 136-142, 2018.
- SILVEYRA, G. R.; CANOSA, I. S.; RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A. Effects of atrazine on ovarian growth, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.192, p. 1-6, 2017.
- SINHORIN, V. D. G.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M. S.; MILÉSKEI, K. M.L.; HANSEN, P. C.; MOREIRA, P. S.; KAWASHITA, N. H.; BAVIERA, A. M. L.; VANIA L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 106, p. 181-187, 2014.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA VEGETAL (SINDIVEG). Produtos agrícolas: Importação de produtos agrícolas e formulados cai em 2015. 13 ed, 2016. Disponível em: < <https://sindiveg.org.br/defensivos-agricolas-importacao-de-produtos-tecnicos-e-formulados-cai-em-2015/>>. Acesso em: 03 de março de 2019.
- SOONKLANG, N.; WANICHANON, C.; STEWART, M. J.; STEWART, P.; MEERATANA, P.; HANNA, P. J.; SOBHON, P. Ultrastructure of Differentiating Oocytes and Vitellogenesis in the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 1402-1415, 2012.
- SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 23, p. 308-313, 2007.
- SOUZA, G. D.; FONTOURA, N. F. Reprodução, longevidade e razão sexual de *Macrobrachium potiuna* (Müller, 1880) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) no Arroio Sapucaia, Município de Gravataí, Rio Grande do Sul. *Nauplius*, v. 4, p. 49-60, 1996.
- SUBRAMONIAM, T. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Science*, v. 77, p 1-2, 2011.

- TIU S. H. K. From Hepatopancreas to Ovary: Molecular Characterization of a Shrimp Vitellogenin Receptor Involved in the Processing of Vitellogenin. *Biology of Reproduction*, v. 79, p. 66-74, 2008.
- US EPA. Research Plan for Endocrine Disruptors. AGENCY, U. S. E. P. Washington 1998.
- VENTURA, E.; WINICK-SILVA, A.; SHINOZAKI-MENDES, R. A. Ovarian development and spawning of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). *Iheringia, Série Zoologia*, v. 109, p. 201-926. 2019.
- VIJAYAVEL, K.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as consequence of naphthalene toxicity in the edible estuarine crab *Scylla serrata*, v. 63, p. 141-147, 2006.
- WEBSTER T. M. U.; LAING, L. V.; FLORENCE, H.; SANTOS, E. M. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science &Tecnology*, v. 48, p. 1271-1279.
- WILDER, M., OKUMURA, T., TSUTSUI, N. Reproductive mechanisms in crustacea focusing on selected prawn species vitellogenin structure, processing and synthetic control. *Aqua-BioScience. Monographs*, v. 3, p.73-110, 2010.
- WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.
- ZARA, F. J.; GAETA, H. H.; COSTA, T. M.; TOYAMA, M. H.; CAETANO, F. H. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, v. 94, p. 134-146, 2013.