

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDINEI DE FREITAS VIEIRA

**TOXICIDADE AGUDA EM ELEUTEROEMBRIÕES DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen*
SUBMETIDOS AO EXTRATO HEXÂNICO de *Ricinus communis***

DOIS VIZINHOS

2020

CLAUDINEI DE FREITAS VIEIRA

**TOXICIDADE AGUDA EM ELEUTEROEMBRIÕES DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen*
SUBMETIDOS AO EXTRATO HEXÂNICO de *Ricinus communis***

**Acute toxicity in eleuteroembryos of jundiá *Rhamdia quelen* submitted to
hexanic extract of *Ricinus communis***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias I/Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira.
Coorientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva.

DOIS VIZINHOS

2020



Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 50

A Dissertação de Mestrado intitulada **TOXICIDADE AGUDA EM ELEUTEROEMBRIÕES DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* SUBMETIDOS AO EXTRATO HEXÂNICO de *Ricinus communis***, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) Claudinei de Freitas Vieira, no dia 28 de abril de 2020, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS AGRÁRIAS, área de concentração **Agroecossistemas**, linha de pesquisa **Manejo e Conservação de Agroecossistemas**, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em **Agroecossistemas**.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Elton Celton de Oliveira - UTFPR-DV

Prof(a). Dr(a). Patrícia Franchi de Freitas - UTFPR-DV

Prof(a). Dr(a). Flávio Endrigo Cechim - IFPR - Quedas do Iguaçu

Este Termo de Aprovação encontra-se na pasta do aluno na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação realizada após a entrega da versão final, incluindo correções necessárias, permitindo o encaminhamento para análise e publicação no Repositório Institucional.

Dedico esse trabalho a Deus, minha família e professores, por me fornecerem as condições necessárias para realiza-lo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por sempre me guiar pelo bom caminho em todas as minhas decisões e me proporcionar ter sempre boas amizades e saúde.

Aos meus pais, Erondina de Souza Vieira e Arcir de Freitas Vieira que me criaram e cuidaram com sabedoria e paciência, sempre estendendo a mão amiga nos momentos mais difíceis, suportando, me apoiando e permitindo que pudesse realizar meus sonhos. Muito obrigado por sempre me apoiarem em minhas decisões e me motivaram nas decisões tomadas.

Agradeço também aos meus irmãos Edinei de Freitas Vieira e Silvana de Freitas Vieira, sempre aprendo com vocês e os amo muito. Minha querida cunhada Maysa de castro que sempre estava disposta em me ajudar. Agradeço também a minha sobrinha Shaiane que sempre me admira e me motiva na minha profissão. Minha família foi e sempre será a base para o meu amadurecimento como pessoa.

Agradeço imensamente a minha fiel companheira Ana Claudia Silvestre e minha filhota amada e querida Sofia de Freitas Vieira. Vocês sempre me dar força e são os motivos para que eu vivo. Obrigado Ana Claudia por sempre me amparar nos momentos mais difíceis, não medindo esforços para me impulsionar, sempre me apoiando em minhas decisões e principalmente por sempre ter paciência comigo, até mesmo nos momentos em que pensei não dar conta dos meus desafios.

Sou profundamente grato ao meu orientador Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira, por me apoiar, me dedicar sua confiança quando me proporcionou a chance de ser seu orientado. Por todos os ensinamentos, conselhos, pela paciência, pela sabedoria, palavras de incentivo até mesmo quando pensei em desistir. Obrigado também por ser um amigo.

Aproveito também para agradecer a Prof. Dra. Nédia Ghisi por ter me ajudado no desenvolvimento do projeto, sempre com muito conhecimento e dedicação.

Agradeço também ao meu coorientador de mestrado professor Everton Ricardi Lozano da Silva que foi meu orientador de TCC que sempre me auxiliou durante a minha trajetória e colaborando com a minha formação. Agradecendo-o também agradeço a Prof. Dra. Michele Potrich, por sempre me auxiliar durante meu caminho, me orientando e contribuindo com a minha formação.

Agradeço também a equipe de trabalho da Estação de Piscicultura – UNESPAR, localizada em União da Vitória – Paraná, em especial ao responsável técnico Renan Gargiel de Oliveira, que não mediu esforços para contribuir com nosso trabalho, nos ajudando no fornecimento dos ovos de Jundiá, utilizados em nossa pesquisa.

Aos colegas de faculdade, mestrado e de laboratório: Lucas Battisti, Darlin Henrique Ramos de Oliveira, Jheniffer Warmling, Ana Paula, Yuri Renan, Natana Zuanazzi, Taína dos Santos, Alexandre Augusto Auache Filho, Bruno Jan Schramm Corrêa, Iara Emanuely Francio, Jéssica Viceli e aos demais colegas que não foram citados e que de alguma maneira contribuíram. Sem a ajuda de vocês, jamais teria conseguido finalizar este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo recurso do PROAP (Programa de Apoio à Pós Graduação), ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Em especial aos professores do PPGSIS e aos demais profissionais que se fizeram presentes em minha formação, diretamente ou indiretamente. Enfim, a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso”

Albert Einstein

RESUMO

Extratos botânicos apresentam atividade inseticida sobre organismos alvos, porém sobre organismos não-alvos precisam ser investigados. O objetivo foi avaliar a sobrevivência e parâmetros toxicológicos, tais como deformidades morfológicas, mobilidade, débito cardíaco e fragmentação no DNA, em eleuteroembriões de *Rhamdia quelen* submetidos ao extrato hexânico de *Ricinus communis*. Para determinar as concentrações deste trabalho foi utilizado como referência a concentração letal (CL_{50}) do extrato hexânico obtida para *Chrysodeixis includens*, lagarta da soja (espécie-alvo). Foram avaliadas as seguintes dosagens: (D1) 50% da CL_{50} , (D2) 25%; (D3) 12,5%; (D4) 6,25%; (D5) 3,12% e (D6) 1,56%; (CTR) Controle negativo; (CTRV) Controle veículo. Os ovos viáveis foram alocados em microplacas de ELISA de 96 poços, nos respectivos tratamentos. Cada tratamento ocupou três colunas da microplaca, sendo necessárias duas microplacas para contabilizar uma réplica. Foram utilizadas 18 réplicas e amostrados dois tempos de exposição para a maioria das análises. A taxa de eclosão foi avaliada em 28hpf e a sobrevivência em 48hpf, 72hpf e 96hpf. As maiores concentrações do extrato (D1 = 1%, D2 = 0,5%, D3 = 0,25% e D4 = 0,125%) inviabilizaram a eclosão e/ou causaram elevada letalidade a posteriori. Apenas nas diluições D5 e D6 os eleuteroembriões tiveram sobrevivência semelhante aos controles. Deformidades morfológicas foram observadas principalmente no grupo D5, sendo os danos craniofaciais, a lordose, a atrofia corporal e as lesões nas nadadeiras as principais anormalidades. A mobilidade e o débito cardíaco foram semelhantes entre os grupos CTR, D5 e D6, exceto o débito em 48hpf que foi menor em D5. O grupo CTRV apresentou menores valores de mobilidade e débito. A taxa de danos ao DNA foi similar entre todos os grupos sobreviventes. As concentrações D5 e D6 apresentam maior potencial para prospecção de um novo produto agrônomo fitossanitário, pois apresentaram baixa toxicidade para os eleuteroembriões.

Palavras-chave: Toxicologia. Organismos não-alvo. Controle alternativo. Biossegurança.

ABSTRACT

Botanical extracts present insecticidal activity on target organisms, but on non-target organisms need to be investigated. The aim was to evaluate survival and toxicological parameters, such as morphological deformities, mobility, cardiac output and DNA fragmentation, in eleutheroembryos of *Rhamdia quelen* submitted to hexane extract of *Ricinus communis*. To determine the concentrations of this work, the lethal concentration (CL₅₀) of the hexanic extract obtained for *Chrysodeixis includens*, soybean caterpillar (target species) was used as reference. The following dosages were evaluated: (D1) 50% of CL₅₀, (D2) 25%; (D3) 12.5%; (D4) 6.25%; (D5) 3.12%; (D6) 1.56%; (CTR) Negative control; (CTRV) Vehicle control. Viable eggs were placed in 96-well ELISA microplates, in the respective treatments. Each treatment occupied three columns of the microplate, requiring two microplates to count a replica. Eighteen replicates were used and two exposure times were sampled for most analyzes. The hatching rate was evaluated at 28hpf and survival at 48hpf, 72hpf and 96hpf. The highest concentrations of the extract (D1 = 1%, D2 = 0.5%, D3 = 0.25% and D4 = 0.125%) unviable the hatching or caused high lethality. The eleutheroembryos survive was similar between D5, D6, and controls. Morphological deformities were observed mainly in D5, with craniofacial damage, lordosis, body atrophy and fins lesions. Mobility and cardiac output were similar between the CTR, D5 and D6 groups, except to cardiac output in 48hpf (lower). The CTRV group showed lower values in both parameters. No significant difference was observed in the rate of DNA damage between the surviving groups. The concentrations D5 and D6 present higher potential for prospecting for a new phytosanitary agronomic product, because they presented low toxicity to the eleutheroembryos.

Keywords: Toxicology. Non-target organisms. Alternate control. Biosecurity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fotografia 1 – Preparação de soluções. A) Amostra da fração hexânica do extrato botânico de mamona, no qual foi realizado a diluição. B) Verificação do pH da água reconstituída. C) Pesagens em balança de alta precisão/calibrada dos sais que foram utilizados na água reconstituída. D) Cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio que foram utilizados na preparação da água reconstituída..... 28**
- Fotografia 2 – Obtenção dos ovos fertilizados do jundiá *R. quelen*. A) Laboratório de indução reprodutiva da piscicultura da UNESPAR, com bancadas e nos fundos os tanques de armazenamento das matrizes. B-C) Coleta e separação dos ovos fertilizados. D) Saco plástico com os ovos fertilizados, usado para armazenamento e transporte. E) Seladora manual de plástico, fazendo o fechamento do saco plástico aerado com os ovos fertilizados. F) Equipe da piscicultura da UNESPAR fazendo a entrega do material.. 29**
- Fotografia 3 – Manejo do material reprodutivo após transporte ao Laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da UTFPR – DV. A) Abertura e manuseio do saco plástico contendo os ovos fertilizados e não fertilizados, estes são visualizados com mais facilidade. B) Seleção dos ovos viáveis alocados em placas de Petri com fundo preto (Cartolina preta). Círculo preto = ovos não fecundados na cor branca. Círculo vermelho - ovos translúcidos viáveis. C) Ovo translúcido e fertilizado (viável) sendo observado em estereomicroscópio..... 30**
- Fotografia 4 – Organização de materiais e soluções do experimento no Laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da UTFPR – DV. A) Microplacas de ELISA com 96 poços devidamente identificadas. B) Soluções-teste separadas em frascos Erlenmeyer. C) Recipientes com as soluções de pipetagem e micropipeta multicanal. D) Pipetagem de 200 µl/poço de cada solução com auxílio da micropipeta multicanal..... 31**
- Fotografia 5 – Deformidade morfológicas em eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 e 96 hpf. A) Indivíduo normal, sem anormalidades. B) Indivíduo com alterações crâniofaciais (círculo vermelho) e edema pericárdico (seta azul). C) Indivíduo albino com sinais de desnutrição. D) Indivíduo com atrofia corporal. E-F) Indivíduos com danos axiais: lordose e escoliose. G) Indivíduo com ausência de barbilhões, danos crâniofaciais (círculo vermelho) e leve encurtamento corporal. H) Indivíduo atrofiado com destaque ao barbilhão dobrado em direção à parte superior do corpo..... 37**
- Fotografia 6 – Fotomicrografias dos nucleóides registrados nos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 e 96 hpf, nas diferentes categorias de classificação para o Ensaio Cometa. Dano 0 = nucleóide normal, sem fragmentação do DNA; Dano 1 a 4 = escala progressiva de fragmentação do DNA... 41**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Taxa de eclosão (A) e frequência relativa da sobrevivência dos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 28, 48, 72 e 96 hpf (B). CTR = grupo controle normal; CTRV = grupo controle veículo; D1 – D6 = diluições de 1% a 0,031% do extrato de mamona. O título dos gráficos representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey..... 36
- Gráfico 2** – Índice de severidade de danos morfológicos observados em *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* ao longo de 48 hpf (A) e 96 hpf (B), bem como o número de indivíduos por categoria de danos (C). CTR= controle; CTRV= controle veículo; D4–D6= diluições de 0,125% a 0,031% do extrato. O título dos gráficos representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.. 39
- Gráfico 3** – Índice de mobilidade (A) e frequência de indivíduos por categoria de mobilidade (B) dos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 e 96 hpf. 0 = nulo/morto. 1 = trêmulo/sem equilíbrio. 2= baixa mobilidade. 4= mobilidade moderada. 6= alta mobilidade. CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey.. 40
- Gráfico 4** – Débito cardíaco em eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 hpf (A) e 96 hpf (B). CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey..... 40
- Gráfico 5** – Índice de danos ao DNA, estabelecido pelos scores do Ensaio Cometa, nos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 hpf (A) e 96 hpf (B). CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores do teste de Kruskal-Wallis... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grau de severidade (Scores) das deformidades por categoria.....	33
---	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Agroecossistemas e produção sustentável	16
2.2	Inseticidas naturais	19
2.2.1	Extrato de <i>Ricinus communis</i> L. (Malpighiales: Euphorbiaceae)	21
2.3	Biossegurança	23
2.4	Ensaio toxicológico com peixes	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Extrato botânico e dosagens do experimento	29
3.2	Organismo não alvo utilizado como bioindicador - <i>Rhamdia quelen</i>	31
3.3	Bioensaio: avaliação do ehrc em diferentes concentrações sobre <i>R. quelen</i> ..	33
3.4	Parâmetros de análise	34
3.5	Análises estatísticas	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Taxa de eclosão e sobrevivência	38
4.2	Deformidades morfológicas.....	38
4.3	Mobilidade	41
4.4	Débito cardíaco.....	43
4.5	Ensaio cometa	44
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Novos interesses na área da agricultura vêm sendo estudados, introduzindo no meio agrônomo um viés ecológico, dando espaço aos Agroecossistemas (CABEL E OELOFSE, 2012). O empenho de cada vez se produzir mais elevou o uso de agrotóxicos nas lavouras, mesmo em ecossistemas naturais (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Os Agroecossistemas não estão imunes aos efeitos adversos das práticas convencionais de controle de pragas, tornando prioritário a necessidade de encontrar opções que sejam menos prejudiciais ao ser humano e aos demais organismos vivos, e uma delas é a utilização dos inseticidas naturais (MAZZOLENI, NOGUEIRA, 2006).

A prospecção de novos extratos botânicos com propriedades inseticidas tem incluído a planta denominada popularmente como mamona, *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) (CUNHA *et al.*, 2006). Os seus metabólitos secundários incluem compostos flavonoides (SUN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011), esteróis (SUN *et al.*, 2010), terpenos (PERES *et al.*, 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ E FERNÁNDEZ, 2011), os quais podem causar danos ao desenvolvimento de insetos e leva-los a morte

Os extratos de *R. communis* são excelentes alternativas para o controle de pragas nos ecossistemas naturais (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010), pois possuem efeito inseticida, como a inibição da alimentação podendo alterar o seu comportamento (BARBOSA *et al.*, 2001). Contudo, estes mesmos compostos podem levar a efeitos letais ou subletais em organismos não alvos, promovendo desde alterações fisiológicas e deformidades morfológicas até o incremento da mortalidade e da imobilidade dos indivíduos (comportamento), fato que precisa ser investigado (SIEGWART *et al.*, 2015).

A biossegurança é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos naturais que, de fato, busquem o equilíbrio entre a produção de alimentos e a preservação das espécies e suas funções nos ecossistemas, garantindo a continuidade dos serviços ecossistêmicos que automaticamente implicará em redução no uso de pesticidas tradicionais. Para isso, é importante utilizar bioindicadores e biomarcadores para analisar a capacidade toxicológica de produtos químicos, sintéticos ou naturais (MARAGONI *et al.*, 2012).

Os procedimentos utilizados nos testes de embriotoxicidade permitem o acesso a informações toxicológicas relevantes, na fase mais sensível de desenvolvimento da espécie, sem a necessidade de sacrificar indivíduos adultos e reprodutivos, estando em consonância

com a princípio dos 3R's. Os organismos aquáticos, quando submetidos a determinadas substâncias tóxicas, podem produzir desde alterações genéticas e enzimáticas até àquelas relacionadas às taxas de fecundidade, viabilidade, eclosão de embriões e deformidades morfológicas (MACPHAIL *et al.*, 2009). Assim, a embriotoxicidade representa uma área com grande potencial a ser explorado, trabalhando com uma fase vital do ciclo de vida das espécies e que possibilita um alerta precoce sobre a periculosidade de substâncias.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de peixe nativa da região sul do Brasil, se destaca por seu rápido crescimento. Esta espécie é amplamente utilizada em estudos toxicológicos para avaliar o efeito de diversos pesticidas, sendo considerada por muitos trabalhos como um modelo experimental. Apesar disso, há uma escassez de informação na literatura a respeito das suas respostas toxicológicas quando submetidos a inseticidas naturais, tais como extratos botânicos, e ainda mais quando na fase larval.

Nesse sentido, pesquisas que buscam a avaliação e/ou o desenvolvimento de produtos naturais com efeito inseticida são de extrema importância. Porém, como citado anteriormente, sabe-se que tais produtos podem causar impactos negativos em espécies silvestres, por exemplo, a *R. quelen*. Tendo como base estas informações, este estudo teve como objetivo, avaliar a sobrevivência e parâmetros toxicológicos, tais como deformidades morfológicas, mobilidade, débito cardíaco e fragmentação no DNA, em eleuteroembriões de *Rhamdia quelen* submetidos a concentrações subletais do EHRC (extrato hexânico de *Ricinus communis*) ao longo de 96 horas pós fertilização (hpf). Além disso, as informações obtidas podem ser usadas como parâmetro comparativo para futuros estudos em toxicologia ambiental e também para relatar às agências reguladoras os efeitos dessa substância na espécie estudada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agroecossistemas e produção sustentável

Desde a “Revolução Verde” o Brasil tem investido e inovado na agricultura estimulando a utilização de sementes híbridas, fertilizantes, pesticidas e máquinas agrícolas com o objetivo de ampliar a produção de alimentos no país. Nesse contexto, os produtores tiveram acesso facilitado a financiamentos e a compra dos insumos e maquinários adequados para esta finalidade (NAVOLAR; RIGNON; PHILIPPI, 2009).

Atualmente, o Brasil é reconhecido mundialmente por ser um grande produtor e exportador de *commodities* agrícolas, a despeito dos impactos ambientais negativos dessa atividade. O país é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (INCA, 2015) e também um dos maiores destruidores de habitats naturais para o emprego da prática agrícola. É justamente por essa situação paradoxal que muitos cientistas e grupos de pesquisa têm buscado trabalhar no desenvolvimento de produtos alternativos no controle de pragas (OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013).

Agrotóxico é um termo generalista, conforme indicado no Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002:

Agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002, p. 1).

Assim, os agrotóxicos incluem os defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas, bem como os seus múltiplos usos, que englobam inseticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas (SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013). Considerando essa alta diversidade, existem mais de 1600 agrotóxicos com mais de 100 classes químicas, utilizados mundialmente na produção de alimentos, havendo mais de 1700 ingredientes ativos diferentes e mais de 350 derivados de éster e sais usados em formulações de pesticidas (SANTANA E CAVALCANTE, 2016).

No meio ambiente, a aplicação de agrotóxicos pode também afetar organismos não-alvos (LINS *et al.*, 2010) ou seja, organismos terrestres e aquáticos que não interferem no processo de produção. Os inseticidas, por exemplo, podem se acumular em ecossistemas aquáticos (GHASEMZADEH *et al.*, 2015) e exercer efeitos tóxicos em crustáceos, peixes, insetos aquáticos, nematoides, anelídeos e zooplâncton (VAZQUEZ *et al.*, 2014). Estes poluentes alcançam o meio aquático através de lixiviação, escoamento superficial ou percolação e infiltração no solo. Além disso, a contaminação pode ser acidental através da lavagem de equipamentos e recipientes (NOVELLI *et al.*, 2016).

Como já mencionado, os interesses nacionais em uma produção de alimentos primários em larga escala elevou o uso de agrotóxicos nas lavouras para o combate de pragas agrícolas, com a justificativa de ser a principal forma de garantir a alta produtividade de alimentos, necessários para abastecer a sociedade humana e seu estilo de vida (OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013). Por outro lado, o uso indiscriminado de agentes químicos tem sido correlacionado a impactos ambientais e na saúde humana. Neste último, é importante destacar efeitos causais como o envenenamento (vômitos, diarreia, dispneia e até o óbito), infertilidade ou incapacidade sexual, aborto espontâneo e/ou malformações congênitas, distúrbios endócrinos, neurotoxicidade e doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, incidência de tumores e câncer, entre outros (NODARI E GUERRA, 2015).

Na perspectiva de atender a novos interesses na área da agricultura, estudos estão propondo uma visão ecológica para os ecossistemas agrícolas, surgindo então, a terminologia de agroecossistemas (MEIRELLES, 2004). O estudo dos fenômenos agrícolas de maneira interdisciplinar vem sendo difundida pela ecologia (ODUM, 2007), a qual auxilia a sociedade a entender melhor a interdependência dos componentes físicos, químicos e biológicos e suas relações diretas com os níveis de produtividade (HECHT, 2002).

Um agroecossistema pode ser administrado e cultivado para ter alta produtividade e atender as relações ecológicas básicas, mostrando-se um caminho sustentável. Em tal contexto, os sistemas alternativos de produção agrícola se expandiram em todo o mundo, e seus métodos de desenvolvimento são diferentes dos convencionais, com ênfase na matéria orgânica e nos processos biológicos para produção de alimentos. Os principais exemplos são a agricultura biodinâmica, agricultura ecológica, agricultura natural, agricultura alternativa e agricultura orgânica (NODARI E GUERRA, 2015).

Na contemporaneidade, a agricultura orgânica vem ganhando espaço nos sistemas agrícolas de produção, chegando a 50,9 milhões de hectares de terras em todo o mundo (WILLER E LERNOUD, 2017). Esse crescimento é decorrente da procura da população por alimentos livres de resíduos químicos, bem como pelo fato da agricultura orgânica reduzir impactos negativos causados pela agricultura convencional, como contaminação de rios e lagos, melhorando a qualidade do solo e matéria orgânica, preservando a biodiversidade, entre outros benefícios (MAZZOLENI E NOGUEIRA, 2006). Em 2015, as exportações orgânicas do Brasil aumentaram 15% em relação ao ano anterior, com um faturamento médio de US \$ 160 milhões (LOZANO; POTRICH; BATTISTI, 2017).

No Brasil, a agricultura orgânica foi estabelecida sob o nome de agricultura alternativa em meados da década de 1970 e foi chamada de agricultura orgânica em 1977, quando o Ministério da Agricultura e Pecuária publicou um relatório contendo várias tendências não convencionais (PENTEADO, 2000). Em 1999, foi formulada a primeira diretiva normativa do MAPA (nº 07, 17 de maio de 1999), estabelecendo o primeiro padrão para a produção de produtos orgânicos. Somente na formulação e implementação da Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, foi formalizada a agricultura orgânica, que definiu e estabeleceu as condições para a produção orgânica, razão pela qual o Brasil passou a ter sua própria Lei de Produtos Orgânicos (FONSECA *et al.*, 2009).

Neste contexto mais sustentável, a agroecologia é uma área chave do conhecimento científico, por apresentar características transdisciplinares, que não esquece do conhecimento tradicional associado e, dessa forma, traz novas perspectivas para os agroecossistemas devido ao uso de práticas, protocolos e metodologias adequadas a sustentabilidade (GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

Nos sistemas orgânicos de produção, ainda há inúmeras práticas inadequadas de manejo, o que também representa um perigo ao equilíbrio destes agroecossistemas. Estas práticas envolvem o uso de inseticidas, degradação de habitat, mudança no uso do solo e introdução de novas espécies. Assim, é necessário ampliar o conhecimento e as estratégias de manejo dos agroecossistemas para que a conservação seja não só uma ferramenta de controle, mas também de fomento a produtividade (NODARI E GUERRA, 2015).

Em tal contexto, os agroecossistemas se tornaram uma alternativa e um novo modelo agrícola que pode beneficiar as pessoas e o meio ambiente através de métodos ecológicos e /ou sustentáveis. Contudo, ainda é necessário buscar novas alternativas, novos produtos com

vida útil mais longa e redução no uso de pesticidas para possibilitar um menor impacto ambiental da produção (AZAPAGIC *et al.*, 2014), com vistas ao desenvolvimento sustentável.

2.2 Inseticidas naturais

Um dos maiores problemas e dificuldades enfrentados pela agricultura moderna é relativo a existência de plantas daninhas e insetos pragas, que competem pelos recursos e/ou agem como agentes patogênicos nos cultivares, causando prejuízos e perda da produtividade (GOULART *et al.*, 2015). Diante disso, a prática mais comum de controle destes organismos é através da pulverização de agentes químicos (herbicidas, fungicidas e inseticidas) em grandes quantidades nas lavouras (ISMAN, 2015).

Este cenário tem cada vez mais se solidificado na agricultura convencional, uma vez que os próprios produtores ao solicitarem financiamentos e seguro da sua produção junto aos bancos, somente o conseguem quando cumprem as exigências de uso de produtos fitossanitários sintéticos em larga escala (DANTAS *et al.*, 2019). Desta forma, observa-se que a prática de uso intensivo de agrotóxicos está mais do que difundida nas práticas agrícolas brasileiras, encontrando-se ancorada em todo o sistema de produção.

Essa situação, como já comentado, leva a inúmeros impactos ambientais e, nas últimas décadas, tem promovido um aumento na demanda pelo desenvolvimento de produtos fitossanitários naturais, pois representam uma alternativa em termos de custo, eficiência e biodegradabilidade em comparação aos produtos sintéticos. Sendo assim, os produtos fitossanitários naturais representam uma alternativa aos tradicionais produtos sintéticos usados na agricultura convencional (SILVA, 2013), e no caso de sistemas agroecológicos de produção, muitas vezes são a única alternativa. Os inseticidas alternativos são obtidos a partir de produtos naturais, originados de um organismo vivo ou substância produzida por ele, que possui atividade inseticida (PENTEADO, 2010).

Entre os diferentes produtos inseticidas naturais, destacam-se os extraídos das plantas, pois são uma fonte promissora de substâncias com diferentes modos de ação sobre insetos e outros organismos (WARMLING, 2018). Nos últimos anos, as pesquisas vêm aprimorando o desenvolvimento de inseticidas naturais, devido à grande variedade e complexidade química destas substâncias (ARAÚJO *et al.*, 2009; LOZANO, POTRICH; BATTISTI, 2017).

O uso de extratos de plantas para o controle de insetos-praga se deve às diferentes propriedades que os compostos presentes nestas plantas possuem (efeitos inseticidas, terapêuticos, repelentes de insetos e antibacterianos). Essas características são decorrentes da presença de moléculas resultantes do metabolismo secundário destes vegetais, por exemplo, flavonoides, taninos e terpenóides (COWAN, 1999), as quais podem causar efeitos tóxicos, deterrente, ovicida e repelente aos insetos (FARIAS, 2012).

Entre os principais grupos de plantas com efeito inseticida, destacam-se os vegetais da família Piperaceae, gênero *Piper*, as quais possuem metabólitos secundários como amidas, ligninas, flavonoides, alcaloides, arilpropanóides e ésteres graxos, que são substâncias com ação inseticida. Além disso, possuem uma enorme variedade de metabólitos secundários e óleos essenciais, além de apresentam pouco efeito negativo sobre mamíferos (SILVA, 2013).

De modo geral, estudos demonstram que plantas que apresentam terpenóides em seus extratos botânicos, por exemplo, apresentam atividade inseticida comprovada sobre organismos alvos e sobre vários insetos-praga (VIEGAS, 2003). Ainda, aquelas que produzem compostos nitrogenados em seus extratos botânicos, tais como alcaloides, oriundas do metabolismo secundário das plantas, comprometem a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos (HOLTZ *et al.*, 2004). Além das propriedades já citadas, outras plantas também apresentam grande potencial inseticida, como o caso do gênero *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina; *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas; *Azadirachta* (Meliaceae), produtoras de azadiractina e *Derris* (Fabaceae), produtoras de rotenóides (DAYAN *et al.*, 2009).

Além destes, vale destacar o potencial inseticida dos vegetais pertencentes a família Annonaceae, gênero *Annona*, conhecidas popularmente como pinha, ata, cherimólia, marolo, fruta-de-conde, pinha-azedada, graviola e condessa (HEUSDEN, 1992). Estas plantas possuem importância farmacológica, atuando como matéria prima de cosméticos e perfumaria, uso na medicina natural, além de apresentar atividade antimicrobiana e inseticida devido à presença de acetogeninas, substâncias que, quando utilizadas contra insetos, atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH, o que causa a morte destes organismos (KESETYANINGSIH, 2012). O extrato aquoso de folha de cinamomo, ramo de pó-de-fumo e de cinamomo também promoveu o controle biológico de larvas da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Yponomeutidae) (DEQUECH *et al.*, 2009).

A respeito dos resultados positivos da aplicação desses produtos naturais, também há

evidências de que dadas substâncias em determinadas concentrações podem afetar negativamente organismos não-alvos (LINS *et al.*, 2010).

Neste sentido, estudos que avaliam o efeito tóxico dos extratos e óleos essenciais de plantas sobre organismos não-alvos aumentaram nos últimos anos, buscando se adequar aos princípios básicos de biossegurança. Além disso, existe um movimento da sociedade pelo desenvolvimento de novas substâncias naturais, que afetem os insetos pragas e reduzam a dependência de pesticidas químicos sintéticos, em busca de uma alimentação mais saudável e sustentável.

2.2.1 Extrato de *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae)

A prospecção de novos extratos botânicos com propriedades inseticidas tem incluído a planta denominada popularmente como mamona, *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) (SIEGWART *et al.*, 2015). Os seus metabolitos secundários incluem compostos flavonoides (SUN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011), esteróis (SUN *et al.*, 2010), terpenos (PERES *et al.*, 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ E FERNÁNDEZ, 2011), os quais podem causar danos ao desenvolvimento de insetos e leva-los a morte. Pesquisas recentes demonstram que extratos de folhas e sementes desta planta apresentam boa eficácia no controle de nematoides e insetos-pragas. Além disso, a planta é exótica, abundante em grande parte do Brasil, possui apelo econômico e, a princípio, tem baixo potencial para causar danos ambientais (GAHUKAR, 2017).

Além de ser um inseticida natural é considerada uma opção para a fabricação de biocombustível, por causar menos impactos ambientais, pois seu uso diminui a emissão de gases na atmosfera (RIZZI; SILVA; MAIOR, 2010). Seus derivados também podem servir como graxas para equipamentos e motores, fabricação de plásticos, tintas e verniz, perfumaria e produtos de limpeza (FRANCISCO *et al.*, 2016).

A mamoneira *Ricinus communis* é considerada como planta perene, de clima seco e ensolarado, originária do continente africano e que tem boa adaptação a diversas condições climáticas. Essas características aliadas a um bom crescimento, boa fertilidade, frutificação contínua e manejo adequado pode potencializar o seu cultivo comercial no Brasil (FRANCISCO *et al.*, 2016). Seu óleo destaca-se por sua riqueza em ácido graxo ricinoléico (90%) e por suas características individuais que possibilitam ampla gama de utilização

industrial (KARIÑHO-BETANCOURT, 2018; SOUJANYA *et al.*, 2016), conforme já exposto. As principais regiões produtoras de mamona no Brasil delimitam-se no Sul, Sudeste e Nordeste com destaque para o estado da Bahia, responsável por cerca de 80% da produção de mamona comercializada (CUNHA; ROCHA; OLIVEIRA, 2017).

Alguns esforços na produção e avaliação de extratos botânicos a base de mamona já foram realizados, com resultados promissores. Almeida *et al.* (2005) investigaram o efeito de sementes de mamona trituradas a 5 e 10% (m/m) no controle de *Callosobruchus maculatus* (caruncho-do-feijão), em grãos macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) durante 180 dias de armazenamento, constatando grande eficiência na mortalidade destes besouros. Em outros trabalhos, a *R. communis* apresentou efeito inseticida sobre ninfas da mosca-branca em folíolos de tomateiro (SOUZA, 2005) e também verificou-se que extratos puros mamona reduzem o percentual de empupamento de lagarta *Anticarsia gemmatalis* (PESSOA *et al.*, 2014).

Adicionalmente, extratos aquosos de frutos verdes de *R. communis* a 10% (m/v) foram testados sobre as lagartas *Spodoptera frugiperda*, constatando-se inibição no seu crescimento e maior tempo de retenção da fase larval (SANTIAGO *et al.*, 2008). Celestino (2011) investigou o efeito do óleo de mamona na concentração 3% (v/v) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e constatou que após quatro ou cinco dias da aplicação houve 70% de mortalidade dos indivíduos. O extrato de mamona também foi avaliado em meio aquoso sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti*, no qual se constatou alto grau de toxicidade nas larvas, acarretando em 100% de mortalidade dos indivíduos em todas as concentrações testadas (NEVES, 2014).

Além destes esforços, o extrato de mamona pode ser extraído por diferentes princípios químicos, no qual cada metodologia resulta em um produto específico, com diferentes níveis de toxicidade no controle do organismo alvo. Esta questão foi recentemente avaliada no controle da lagarta-falsa-medideira *Chrysodeixis includens*, constatando-se que o extrato de mamona, em fração hexânica, foi aquele que apresentou o melhor desempenho (WARMLING, 2018). O referido autor verificou que a concentração de 2% da fração hexânica foi a que causou maior efeito letal (CL50) no tempo de análise.

De fato, os extratos a base de mamona parecem fornecer excelentes alternativas para o controle de pragas nos ecossistemas naturais (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010), inibindo a alimentação dos insetos (SAITO *et al.*, 2004) e alterando o seu comportamento

(BARBOSA *et al.*, 2001). Contudo, estes mesmos compostos podem levar a efeitos letais ou subletais em organismos não alvos, promovendo desde alterações fisiológicas e deformidades morfológicas até o incremento da mortalidade e da imobilidade dos indivíduos (comportamento), fato que precisa ser investigado.

Neste sentido, Santos *et al.* (2008) ao utilizarem o extrato aquoso de folhas de mamona sobre ovos e ninfas de quinto instar do hemíptero predador *Podisus nigrispinus* (organismo não-alvo) observaram que concentrações de 7% e 10% foram suficientes para causar uma elevada mortalidade. Além deste, verificou-se que o extrato hexânico de mamona causou grande interferência reprodutiva e na emergência da microvespa parasitóide *Telenomus podisi*, que é utilizada no controle biológico de percevejos pragas (OLIVEIRA, 2020).

Ainda temos poucos estudos que avaliam os potenciais dos efeitos adversos destes extratos botânicos sobre espécies silvestres não alvos, tais como os peixes e outros vertebrados, que apresentam maior similaridade genética e fisiológica com os humanos (MORALES, 2008).

2.3 Biossegurança

O uso de produtos naturais requer vários procedimentos com a finalidade de minimizar possíveis danos à saúde dos profissionais responsáveis pela produção e do consumidor final. Desde a antiguidade, as plantas exercem um papel fundamental e são utilizadas na cura de diversas doenças, e em algumas localidades, as plantas representam a única forma de tratamento de determinadas patologias (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; SANTANA *et al.*, 2018).

Porém, essas plantas podem ser consideradas tóxicas e quando se usa de maneira incorreta podem oferecer riscos à saúde humana. Dessa forma, a manipulação, produção e utilização desses produtos naturais e fitoterápicos devem estar de acordo com normas específicas. A Resolução sobre o registro de medicamentos fitoterápicos estabelece, por exemplo, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) desses produtos (BRASIL, 2010; PIRIZ *et al.*, 2013 SOUSA; SANTOS; ROCHA, 2019). Devido ao grande potencial tóxico é extremamente necessário que os manipuladores conheçam os riscos relacionados à exposição destes extratos que se originam das plantas, implantando boas práticas tanto no processo de produção quanto

na utilização, levando em consideração as condutas de biossegurança (SANTOS *et al.*, 2011; SANTANA; SILVA, 2019).

Esta questão de biossegurança é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos naturais que, de fato, busquem o equilíbrio entre a produção de alimentos e a preservação das espécies e suas funções nos ecossistemas, garantindo a continuidade dos serviços ecossistêmicos que automaticamente implicarão em redução no uso de pesticidas tradicionais. Portanto é de significativa relevância o desenvolvimento de estudos que evidenciem a importância da biossegurança na utilização de óleos essenciais ou extratos botânicos que serão testados e avaliados em organismos vivos como os animais.

Entre as diferentes propriedades dos óleos essenciais de plantas que foram descritas, destacam-se o anticâncer, sedativo, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, anestésico local, antiespasmódico e repelente de insetos (BAKKALI *et al.*, 2008). Além de avaliar a potencial atividade farmacológica ou toxicidade dos óleos essenciais, as pesquisas relacionadas à separação de possíveis atividades ou substâncias tóxicas também são muito importantes, porque quando esses efeitos estão associados a determinadas substâncias, torna-se possível a determinação de padrões de qualidade e segurança para utilização (BENOVIT, 2011).

O produto que foi testado neste trabalho foi desenvolvido em laboratório e avaliado por alunos do programa de mestrado em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-DV). Um dos trabalhos realizado por Ramos (2020) teve como objetivo avaliar a seletividade do extrato hexânico de *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) ao parasitoide *Telenomus podisi*, em condições de laboratório. Os resultados concluem que a preferência de parasitismo de fêmeas de *T. podisi* foi significativamente maior por ovos não tratados com o Extrato Botânico de *R. communis* (EHRC) e que para o percentual de emergência, razão sexual, período ovo-adulto e longevidade o EHRC é seletivo ao parasitoide *T. podisi*. Em outro trabalho, realizado por Warmling (2018), o objetivo foi avaliar o efeito letal e subletal de extratos vegetais hidroalcoólicos e frações purificadas sobre *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório e, identificar os metabólitos secundários, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados concluem que os extratos purificados de *R. communis* possuem potencial inseticida para controle de *C. includens*, sendo que a CL₅₀ de EHRC causou 75% de mortalidade sendo considerado o maior percentual de letalidade sobre larvas de *C. includens*.

Ambos os trabalhos fazem parte de uma linha de pesquisa, e juntos tentam, em conformidade com o presente trabalho, verificar o potencial do extrato hexânico de *Ricinus communis* (EHRC). Posteriormente, com as comprovações necessárias e pesquisas baseadas em dados científicos, esses pesquisadores buscam viabilizar a utilização do extrato no combate de determinados insetos-pragas que existem nos ecossistemas.

A utilização de inseticidas químicos sintéticos tem sido o principal método de controle de insetos-praga. Porém, seu uso indiscriminado e incorreto tem aumentado o número de aplicações e diminuído sua eficiência, principalmente devido ao surgimento de populações de insetos resistentes. Tal uso agrava o problema de contaminação dos produtos agrícolas, agricultores e do ambiente. Desta forma, medidas de controle que causem menor impacto ambiental são de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso de plantas inseticidas como promissora ferramenta para controle de insetos (KLOCKE, 1987).

O extrato hexânico de *R. communis*, conforme os trabalhos citados anteriormente, se destaca por apresentar um potencial inseticida vegetal, sendo de modo geral tóxico a insetos. Tal potencial permite a sua exploração como inseticida botânico para o controle de insetos-praga, como indicado no estudo de Warmling (2018) para o controle de *C. includens*. Porém nos trabalhos, e em literatura, este mesmo potencial não é evidenciado para organismos não-alvos. Deste modo, é evidente que os testes que fazem um diagnóstico em organismos não-alvos são de extrema importância.

Se comprovado que determinados extratos em baixas quantidades, não causam impactos negativos nos organismos não alvos, os inseticidas botânicos podem ser aplicados no campo ou de diferentes maneiras no controle de organismos que degradam ou trazem prejuízos as lavouras. Estes produtos podem representar uma alternativa para o manejo de pragas nas lavouras, controlando eficientemente insetos-pragas.

2.4 Ensaios toxicológicos com peixes

Para determinar as doses letais e subletais de extratos botânicos e outros inseticidas nos organismos vivos, são empregados testes de toxicidade aguda ou crônica (RAGASSI; AMÉRICO-PINHEIRO; SILVA-JORNOR, 2017). O teste de toxicidade aguda refere-se a um teste que cobre exclusivamente parte do ciclo de vida do organismo em teste, geralmente avaliando sua mortalidade ou fixação, impacto em reações bioquímicas e metabolismo. Já o

teste de toxicidade crônica, requer exposição a longo prazo e pode cobrir toda a vida útil do organismo que está sendo testado. Neste último, geralmente são avaliados parâmetros subletais, tais como reprodução, deformidades e efeitos sobre o crescimento (HAMADA, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos que utilizam espécies de peixes vêm sendo bem aceitos em avaliações de riscos ambientais e de produtos químicos, no estabelecimento de critérios da qualidade da água, em avaliações de efluentes e no monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos. Os peixes apresentam características vantajosas nestes testes, pois possuem um ciclo de vida documentado, as primeiras fases do desenvolvimento embrionário muito sensíveis a contaminantes, em muitas espécies já existem informações científicas disponíveis sobre a sua fisiologia, genética, comportamento, facilitando a interpretação dos resultados (BOZZO, 2007), e tem contato direto com o ambiente aquático.

Neste sentido, foi desenvolvido um ensaio agudo com embriões e larvas de peixes pela German Standardisation Organisation (DIN), o qual foi denominado de Fish Embryo Toxicity Test (FET) (OECD 203, 1992). O FET é um método interessante, pois, além de ser considerado alternativo ao ensaio agudo padrão com organismos jovens ou adultos (EMBRY *et al.*, 2010), é mais informativo (DOMINGUES *et al.*, 2010) e abrange uma fase de desenvolvimento que, geralmente, não é protegida pela legislação dos países (LAMMER *et al.*, 2009), sendo também mais econômico e eticamente mais adequado por seguir o princípio dos 3R's. Ainda de acordo com Lammer *et al.* (2009), as fases iniciais de desenvolvimento de peixes são excelentes modelos em estudos voltados para a compreensão dos mecanismos tóxicos e para a indicação de possíveis efeitos adversos a longo prazo.

Contudo, esse desenvolvimento inicial dos peixes apresenta diferentes terminologias para as etapas iniciais do ciclo de vida, o que repercuti sobre o entendimento dos trabalhos. Uma classificação antiga, proposta por Woynarovich e Horváth (1983), delimita que o período larval compreende o momento a partir da eclosão até a primeira alimentação, sendo posteriormente sucedido pelo período pós-larval seguido do período juvenil. Recentemente, esta categorização do ciclo inicial de desenvolvimento dos peixes foi revisada e o período larval considerado somente a partir do início da alimentação exógena. A fase endotrófica foi denominada de eleuteroembrião (BELANGER *et al.*, 2010; STRAHLE *et al.*, 2011), a qual corresponde do momento da eclosão até o consumo total do vitelo. Pesquisas com o peixe zebra (zebrafish), *Danio rerio*, em teste químico com bisfenol, por exemplo, considerou os

peixes como eleuteroembriões antes das 120 horas após a fertilização (hpf), depois deste período já foi considerado larva. Diante do exposto, no presente estudo foi utilizada a terminologia proposta por Balon (2002), classificando assim os organismos recém-eclodidos como eleuteroembriões, até a primeira alimentação.

A eclosão dos ovos de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) ocorre entre 27 a 36 horas após a fertilização (hpf), dependendo da temperatura da água (PARRA *et al.*, 2008). Nos eleuteroembriões, após 24hpf, a boca é formada e apresenta movimentos mandibulares e, após 48hpf, movimentos operculares, com diminuição do saco vitelínico. No quarto dia após a eclosão, o saco vitelínico é totalmente absorvido e a fase larval propriamente dita tem início, sendo necessária a alimentação exógena. No quinto dia, observam-se os barbilhões bem desenvolvidos, denticulos nas maxilas, olhos pigmentados, nadadeiras peitorais e caudais formadas. A morfogênese estará praticamente completa após 4 meses, dando início a fase juvenil (GOMES *et al.*, 2000).

Devido a importância de se investigar o potencial toxicológico do EHRC em organismos vertebrados e dada a elevada sensibilidade das fases iniciais de desenvolvimento de peixes, torna-se fundamental a implantação de bioensaios agudos e crônicos para delimitação de concentrações subletais que possam ser exploradas para o desenvolvimento de um produto seguro para o homem e o meio ambiente. Como modelo biológico para a realização desta pesquisa, utilizou-se o peixe neotropical nativo conhecido como jundiá, cujo nome científico é *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), sendo pertencente à família Heptapteridae e a ordem Siluriformes. A referida espécie tem sido utilizada como potencial bioindicadora de qualidade ambiental em agroecossistemas, sendo também uma excelente alternativa aos estudos embriotóxicológicos. O jundiá se destaca por seu rápido crescimento, fácil adaptação à criação intensiva e por apresentar uma elevada taxa de fecundação, com cerca de 1500 ovos por grama de material extrusado (SOBJAK *et al.*, 2017).

Esta espécie é amplamente utilizada em bioensaios de diferentes áreas do conhecimento, sendo considerada um modelo experimental para estudos toxicológicos no Brasil. As fases iniciais do desenvolvimento de *R. quelen* foram alvo de diversos estudos na área de embriotoxicidade, com a sua exposição ao herbicida glifosato (SOBJAK *et al.*, 2017), ao herbicida 2,4-D, a retardantes de chama (FOLLE *et al.*, 2020) e a efluentes industriais (SILVA *et al.*, 2020). Apesar disso, há uma escassez de informação na literatura a respeito das

suas respostas toxicológicas quando submetidos a inseticidas naturais, tais como extratos botânicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrato botânico e dosagens do experimento

Para o desenvolvimento do experimento, primeiramente foi realizada a extração, em fração hexânica, do extrato botânico de *R. communis*. Para tal, os frutos de *R. communis* foram coletados em área de vegetação nativa, próximo a comunidade de Nova Lurdes, interior do município de São João – PR, sob as coordenadas de latitude e longitude 25°46'45.70"S, 52°51'8.16"O e altitude de 509 metros. A coleta foi realizada no mês de dezembro de 2018, durante o período vespertino, entre 15h e 17h.

Para fins de identificação botânica e registro de exemplares confeccionou-se uma exsicata do espécime coletada, sendo está depositada no herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) sob o registro DVPR 6012. O material vegetal coletado permaneceu em secagem em sombra por aproximadamente 24 h. Na sequência, os frutos foram acondicionados em papel tipo Kraft (60 X 80 cm), permanecendo em estufa de secagem de circulação forçada por 48 h a 60°C. Após a secagem completa, tanto dos frutos como das sementes, realizou-se a trituração em moinho de facas tipo Willey (ALPAX), até a obtenção de um pó fino com granulometria aproximada de 0,5 mm. Em seguida, para o preparo dos extratos, diluiu-se 20 g do pó em 200 mL de álcool 80%, em recipientes Erlenmeyer com capacidade de 250 mL.

O pó em mistura com o álcool 80% foi colocado em banho de água termostatizado a 60°C por 30 minutos. Posteriormente o extrato obtido foi filtrado em um balão Kitasato, com membrana filtrante de 8 µ, marca UNIFIL, com o auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE058), em pressão constante de 1,2 Kgf/cm². Após a filtragem, o extrato foi submetido ao processo de rotaevaporação, em evaporador rotativo (MARCONI – MA 120), sob temperatura entre 55 a 60°C, acoplado a uma bomba de vácuo sob pressão constante de 0,35 Kgf/cm² para a retirada do álcool 80%.

Após este procedimento, os compostos restantes foram ressuspensos em água destilada até atingir novamente o volume de 200 mL, sendo denominado extrato bruto. O extrato bruto foi fracionado por meio da técnica de extração líquido-líquido (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Com o auxílio de um funil de separação com capacidade volumétrica de 1.000 mL colocou-se o volume de 250 mL do extrato bruto de *R. communis* e

250 mL do extrator hexano. A mistura foi agitada manualmente por cerca de um minuto para obter maior homogeneização e após 15 minutos de repouso ocorreu a separação de duas fases. O extrato bruto ficou depositado na parte inferior do funil e a fração hexânica na parte superior, sendo esta última coletada através da torneira do funil de separação. A fração hexânica foi novamente encaminhada para o evaporador rotativo (MARCONI – MA 120) em temperatura de 42 a 45°C, para a remoção completa dos solventes. O extrato resultante foi armazenado em frasco Erlenmeyer e acondicionado em refrigerador (4°C) ao abrigo da luz, até a realização dos bioensaios.

A concentração do EHRC utilizada como referência neste estudo foi de 0,02 (2,0%), que apresentou Concentração Letal Média (CL₅₀) para para larvas de *Chrysodeixis includens*, conforme Warmiling (2018). Partindo-se deste valor de referência realizou-se a definição das diluições testadas neste experimento sobre a espécie não-alvo.

A fração hexânica do extrato (Figura 1A) foi inicialmente solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) a 2,5% e depois misturada em água reconstituída para a obtenção das diferentes concentrações utilizadas neste trabalho: (D1) 50% da CL₅₀ para *C. includens*, (D2) 25% da CL₅₀; (D3) 12,5% da CL₅₀; (D4) 6,25% da CL₅₀; (D5) 3,12% da CL₅₀; (D6) 1,56% da CL₅₀, ou seja, as concentrações de 1%; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031% do ECRH. Além destas dosagens, foi realizada a exposição das larvas de *Rhandia quelen* somente em água reconstituída (CTR) para o controle negativo e também em água destilada com 2,5% de DMSO para o controle veiculo (CTRV).

A água reconstituída foi preparada a partir da adição de 0,0065g de Cloreto de Cálcio, 0,1335g de Sulfato de Magnésio, 0,0004g de Cloreto de Potássio e 0,0105g de Bicarbonato de Sódio em 1 L de água destilada (Figura 1D).

Fotografia 1 - Preparação de soluções A) Amostra da fração hexânica do extrato *Ricinus communis*, no qual foi realizado a diluição. B) Verificação do pH da água reconstituída. C) Pesagens em balança de alta precisão/calibrada dos sais que foram utilizados na água reconstituída. D) Cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio que foram utilizados na preparação da água reconstituída



Fonte: Autoria própria (2020)

3.2 Organismo não alvo utilizado como bioindicador - *Rhamdia quelen*

Os ovos do jundiá *Rhamdia quelen* foram adquiridos do centro de piscicultura da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Câmpus de União da Vitória. Neste local foi realizada a indução da maturação gonadal de matrizes parentais da espécie. Nas fêmeas foram administradas duas injeções intramusculares de extrato de hipófise de carpa nas doses de 0,5 e 4,5 mg/kg, respectivamente, com intervalo de 8h entre as aplicações. Os machos receberam apenas uma injeção de 0,5 mg/kg de hipófise de carpa, concomitante a segunda aplicação nas fêmeas.

As matrizes parentais (uma fêmea e dois machos) foram dispostas juntas em um pequeno tanque para realizar a desova e a espermição, sem a necessidade da extrusão mecânica. Após aguardar um período de cerca de 10 horas, as matrizes depositaram o material reprodutivo no tanque, o qual foi esvaziado para viabilizar a retirada dos ovos fertilizados (Figura 2). Com auxílio de uma rede apropriada, os ovos foram coletados e, em seguida, embalados em um saco aerado com a água do próprio local, visando o seu transporte. A água

do local apresentou uma temperatura controlada em torno de 25 °C e pH próximo a 7,5.

A fertilização dos ovos ocorreu aproximadamente as 7:00h da manhã do dia de início do experimento e, logo após, realizou-se o seu transporte para o laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da UTFPR-DV, visando a continuidade dos procedimentos metodológicos.

Fotografia 2 – Obtenção dos ovos fertilizados do jundiá *R. quelen*. A) Laboratório de indução reprodutiva da piscicultura da UNESPAR, com bancadas e nos fundos os tanques de armazenamento das matrizes. B- C) Coleta e separação dos ovos fertilizados. D) Saco plástico com os ovos fertilizados, usado para armazenamento e transporte. E) Seladora manual de plástico, fazendo o fechamento do saco plástico aerado com os ovos fertilizados. F) Equipe da piscicultura da UNESPAR fazendo a entrega do material



Fonte: Autoria própria (2020)

Transcorrido 8 horas após a fertilização (hpf), os ovos da espécie foram avaliados em sua maioria em escala macroscópica (Figura3) e alguns em estereomicroscópio para verificar a sua fecundação e o início da embriogênese. Foram considerados ovos viáveis aqueles que estavam em divisão, com aspecto translúcido. Os demais com características diferentes (opacos) foram considerados não fecundados e descartados.

Fotografia 3 – Manejo do material reprodutivo após transporte ao Laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da UTFPR – DV. A) Abertura e manuseio do saco plástico contendo os ovos fertilizados e não fertilizados, estes são visualizados com mais facilidade. B) Seleção dos ovos viáveis alocados em placas de Petri com fundo preto (Cartolina preta). Círculo preto = ovos não fecundados na cor branca. Círculo vermelho - ovos translúcidos viáveis. C) Ovo translúcido e fertilizado (viável) sendo observado em estereomicroscópio



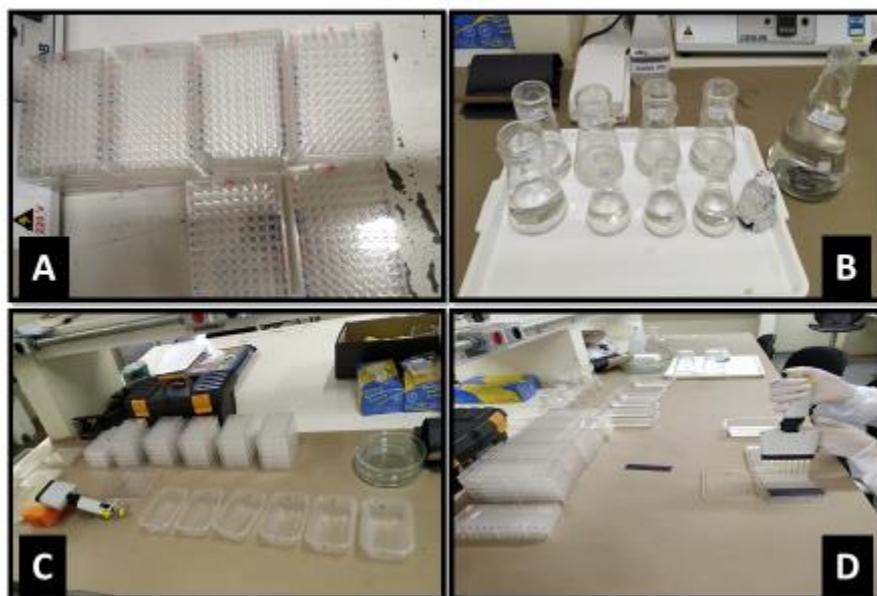
Fonte: Autoria própria (2020)

3.3 Bioensaio: avaliação do EHRC em diferentes concentrações sobre *R. quelen*

As diluições já relatadas do EHRC foram preparadas minutos antes da exposição dos ovos viáveis, bem como a solução do controle negativo e do controle veículo (Figura 4B). Ainda, previamente pipetou-se as respectivas soluções com uma micropipeta multicanal (8 canais), no volume de 200 μ l/poço, em microplacas de ELISA, conforme o tratamento e número de repetições (Figura 4C).

Os ovos viáveis foram então alocados nas microplacas de ELISA de 96 poços, cuja distribuição dos poços está organizada em 12 colunas com 8 unidades em cada e uma capacidade máxima de 350 μ l/poço, com auxílio de pipetas de Pasteur. Cada tratamento ocupou três colunas, sendo necessárias duas microplacas para completar os oito tratamentos (seis diluições e dois controles). Assim, a cada duas microplacas se teve uma réplica. A distribuição dos tratamentos nas microplacas foi realizada através de blocos inteiramente casualizados. Ao todo, foram utilizadas 18 réplicas (36 microplacas), sendo nove para investigar os efeitos em 48hpf e mais nove para os de 96hpf. Do último tempo, cinco réplicas foram reservadas para as análises de taxa de eclosão, sobrevivência, débito cardíaco e capacidade natatória das larvas. O conjunto das microplacas foi acondicionado em uma estufa BOD com temperatura controlada em 25°C e fotoperíodo desligado (somente escuro).

Fotografia 4 – Organização de materiais e soluções do experimento no Laboratório de Reprodução Animal e Biologia Molecular da UTFPR – DV. A) Microplacas de ELISA com 96 poços devidamente identificadas. B) Soluções-teste separadas em frascos Erlenmeyer. C) Recipientes com as soluções de pipetagem e micropipeta multicanal. D) Pipetagem de 200 µl/poço de cada solução com auxílio da micropipeta multicanal



Fonte: Autoria própria (2020)

Ao todo foram utilizados 3.456 ovos viáveis, sendo os demais congelados imediatamente para interromper a embriogênese e impedir o início da formação cefálica dos indivíduos, que ocorre em 14hpf (PEREIRA *et al.*, 2006). Posteriormente, o excedente foi descartado por empresa especializada em destinação de resíduos.

Durante o experimento, houve necessidade de realizar trocas de 100µl da solução-teste de todos os poços, a cada 24 horas (ensaio do tipo semiestático), para evitar alterações nos parâmetros da água. Adicionalmente, foi realizada a reposição das soluções-teste, nas suas respectivas concentrações, para evitar a degradação dos compostos.

Todos os métodos e procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Pesquisa com o Uso de Animais sob o parecer nº 2019-05/2019.

3.4 Parâmetros de análise

A taxa de eclosão foi avaliada em 28hpf, com base no tempo documentado na literatura para a espécie (GOMES *et al.*, 2000). A análise foi realizada em quintuplicatas e considerou eclodida a larva que apresentou movimento da cauda e rompimento do córion. Nas

mesmas placas foi ainda avaliada diariamente a sobrevivência, nos tempos de 48hpf, 72hpf e 96hpf. Foram consideradas vivas àquelas larvas que apresentaram batimentos cardíacos.

O débito cardíaco e a mobilidade das larvas foram avaliados em 48 e 96hpf, em quadruplicatas, amostrando-se cinco indivíduos de cada tratamento, os quais foram selecionados por sorteio (randomicamente). Assim, os mesmos indivíduos sorteados em 48hpf foram novamente avaliados em 96hpf. O batimento cardíaco de cada amostra foi contabilizado durante 15 segundos e multiplicado por quatro para computar um minuto.

Para análise da mobilidade natatória das larvas, foram avaliadas alterações na sua capacidade de deslocamento, na velocidade de reação e equilíbrio diante de um estímulo mecânico realizado com a ponteira de micropipeta, devidamente esterilizada. As reações foram classificadas nas seguintes categorias: 0 (sem reação); 1 (sem equilíbrio e movimentos trêmulos); 2 (baixa mobilidade e equilíbrio comprometido); 4 (mobilidade moderada); 6 (resposta rápida e mobilidade normal). Para sumarizar os efeitos na capacidade natatória das larvas desenvolveu-se um índice de mobilidade por réplica (Equação 1):

$$IM = \sum_{i=0}^6 (i \times n) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde o IM = índice de mobilidade, i = classe de comportamento natatório, a qual varia de 0 a 6 e n = número de indivíduos em cada classe.

Para análise das deformidades foram selecionados aleatoriamente 30 indivíduos por tratamento e tempo de exposição (48 e 96hpf). Os indivíduos foram acondicionados em cinco tubos de 1,5mL/tratamento/tempo, sendo inicialmente anestesiados com 100 mg/L de eugenol e posteriormente sacrificados com uma sobredosagem do anestésico (200 mg/L), de modo a evitar o seu sofrimento, segundo o protocolo de Fernandes *et al.* (2017). Por fim, as larvas foram fixadas com 10% formol e mantidas em geladeira a 4°C.

As anormalidades morfológicas foram analisadas em estereomicroscópio e classificadas de acordo com as categorias de danos (axial, nadadeiras, craniofacial e torácico-abdominal) propostas por Powers *et al.* (2011). Dentro de cada categoria, as diferentes deformidades receberam uma pontuação conforme o seu grau de severidade (Tabela 1). Então, um índice de severidade por indivíduo foi calculado pela soma da pontuação de cada categoria.

Tabela 1- Grau de severidade (Scores) das deformidades por categoria

Categorias	Anormalidade	Score
Axial	Atrofia corporal	4
	Cauda retorcida	4
	Lordose	4
	Cifose e Escoliose	4
Nadadeira	Lesões	1
	Danos teratológicos	4
Crâniofacial	Olhos reduzidos ou ausentes	4
	Deformidade cranial	4
	Deformidade bucal	3
	Barbilhões reduzidos ou ausentes	4
Torácico-Abdominal	Edema pericárdico	4
	Edema no saco vitelínico	3

Fonte: Autoria própria (2020)

Adicionalmente, cinco *pools* de 15 larvas por tratamento nos tempos de 48 e 96hpf foram usados para realização do ensaio cometa, conforme protocolo de Speit and Hartmann's (1999), modificado de acordo com Ferraro *et al.* (2004). As larvas coletadas foram acondicionadas em tubos de plástico de 2 mL (10 por tubo), com o mínimo de solução possível, anestesiadas com eugenol e resfriadas a 4 °C. Foi adicionado 150 µL de soro bovino fetal nos tubos, homogeneizado e, em seguida, pipetado 40 µL para misturar em 100 µL de 0,5% agarose de baixo ponto de fusão (LMP). O volume foi espalhado sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose normal, resfriado e adicionado em solução de *lise*, visando degradação das membranas celulares e nuclear.

A solução de *lise* foi composta de NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%). Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH>13 por 25 minutos. A eletroforese foi conduzida por 30 min, a 300 mA e 25V, seguida pela neutralização com tampão-TRIS (0.4 M, pH 7.5) e fixação em etanol por 10 min. As lâminas com os nucleóides foram corados com 0,02 g/mL de brometo de etídeo e

analisadas em microscópio de fluorescência, contabilizando-se 100 nucleóides que foram classificados em cinco classes, de acordo com o fluxo de migração dos fragmentos de DNA: 0 (sem dano aparente), 1-4 (escala progressiva de dano). Adicionalmente, calculou-se um escore para cada amostra, multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo número da classe, de acordo com a metodologia descrita por Collins (2004).

3.5 Análises estatísticas

Os parâmetros de análise coletados neste estudo foram primeiramente checados em relação aos pressupostos estatísticos de normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene (QUINN E KEOUGH, 2002). A taxa de eclosão, a sobrevivência, o débito cardíaco e o índice de mobilidade cumpriram os requisitos básicos dos testes paramétricos e foram submetidos aos testes de ANOVA (uma ou duas vias) seguido pelo teste de Tukey. O índice de danos do cometa foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn (quando necessário) devido a falta de normalidade dos resíduos à 5% de probabilidade.

As análises estatísticas e os gráficos de médias foram elaborados no software Statistica 8.0 ® (SILVA E AZEVEDO, 2009). Para o gerenciamento das planilhas e os gráficos de frequência utilizou-se o software Excel, versão 2013.

4 RESULTADOS

4.1. Taxa de eclosão e sobrevivência

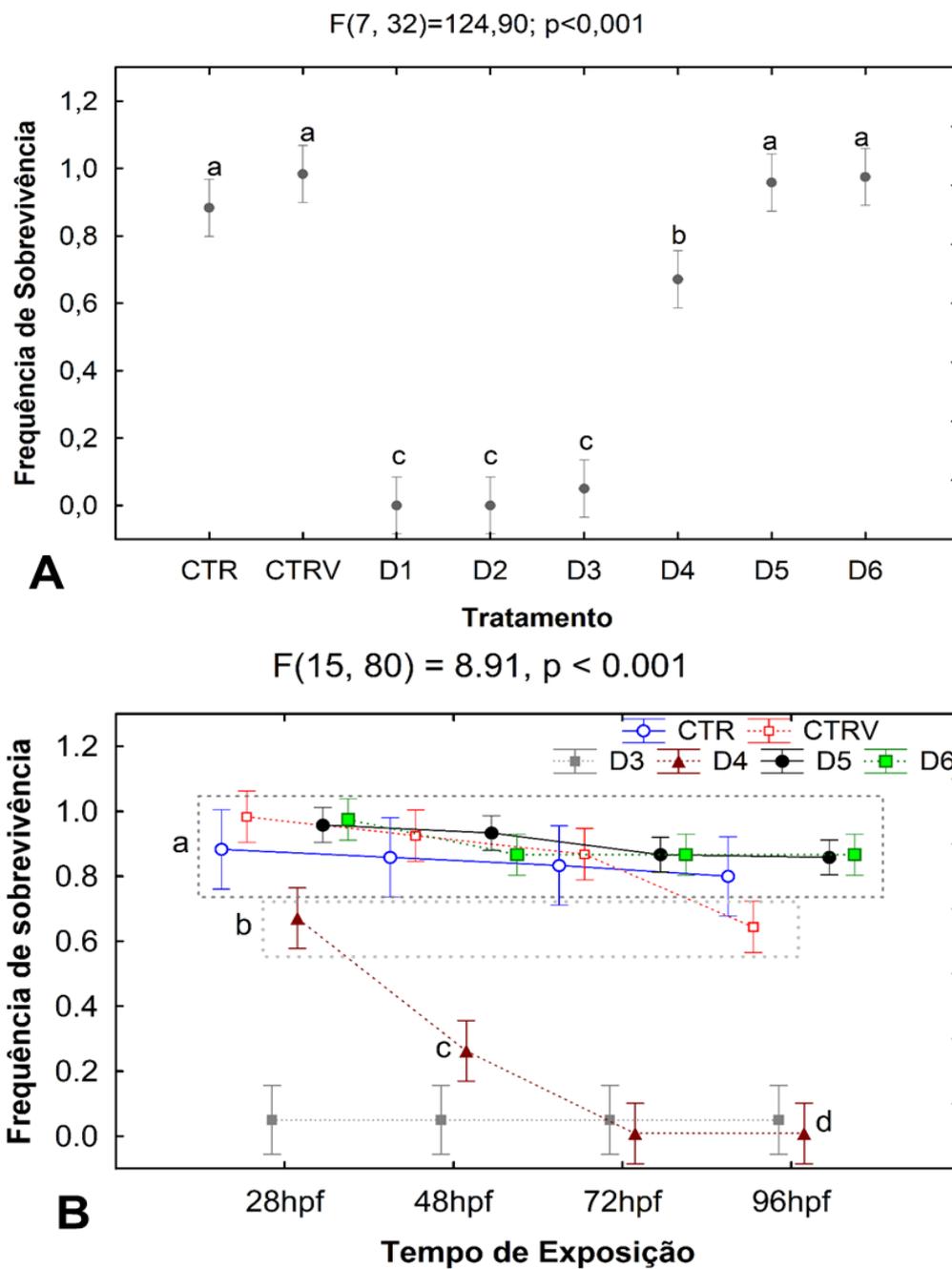
Foi possível evidenciar que as maiores concentrações do EHRC (D1 = 1%, D2 = 0,5% e D3 = 0,25%) inviabilizaram significativamente a eclosão dos ovos e foram prejudiciais ao desenvolvimento da fase inicial de vida de *R. quelen*. Nas diluições D1 e D2 não ocorreram eclosões, na D3 a taxa de eclosão foi de 0,5%, na D4 de 67%. Já nas diluições D5 e D6 a taxa de eclosão foi superior a 90%, não diferindo significativamente dos grupos controles (Gráfico 1A).

A análise da sobrevivência foi realizada excluindo-se os grupos D1 e D2, devido aos 100% de inviabilidade na eclosão, e permitiu evidenciar que os grupos controle e aqueles expostos as diluições D5 e D6 tiveram grande similaridade na sobrevivência transcorrida as 96 hpf. Vale ressaltar que o CTRV apresentou uma taxa de sobrevivência semelhante aos grupos anteriormente relatados até 72 hpf, demonstrando um pequeno decréscimo significativo na sua sobrevivência em 96 hpf. O grupo D4 apresentou uma redução significativa na sobrevivência em 48 hpf, com mortalidade de quase todos os indivíduos ao final de 96hpf. O grupo D3 apresentou um reduzido número de indivíduos sobreviventes do início ao fim do experimento (Gráfico 1B).

4.2 Deformidades morfológicas

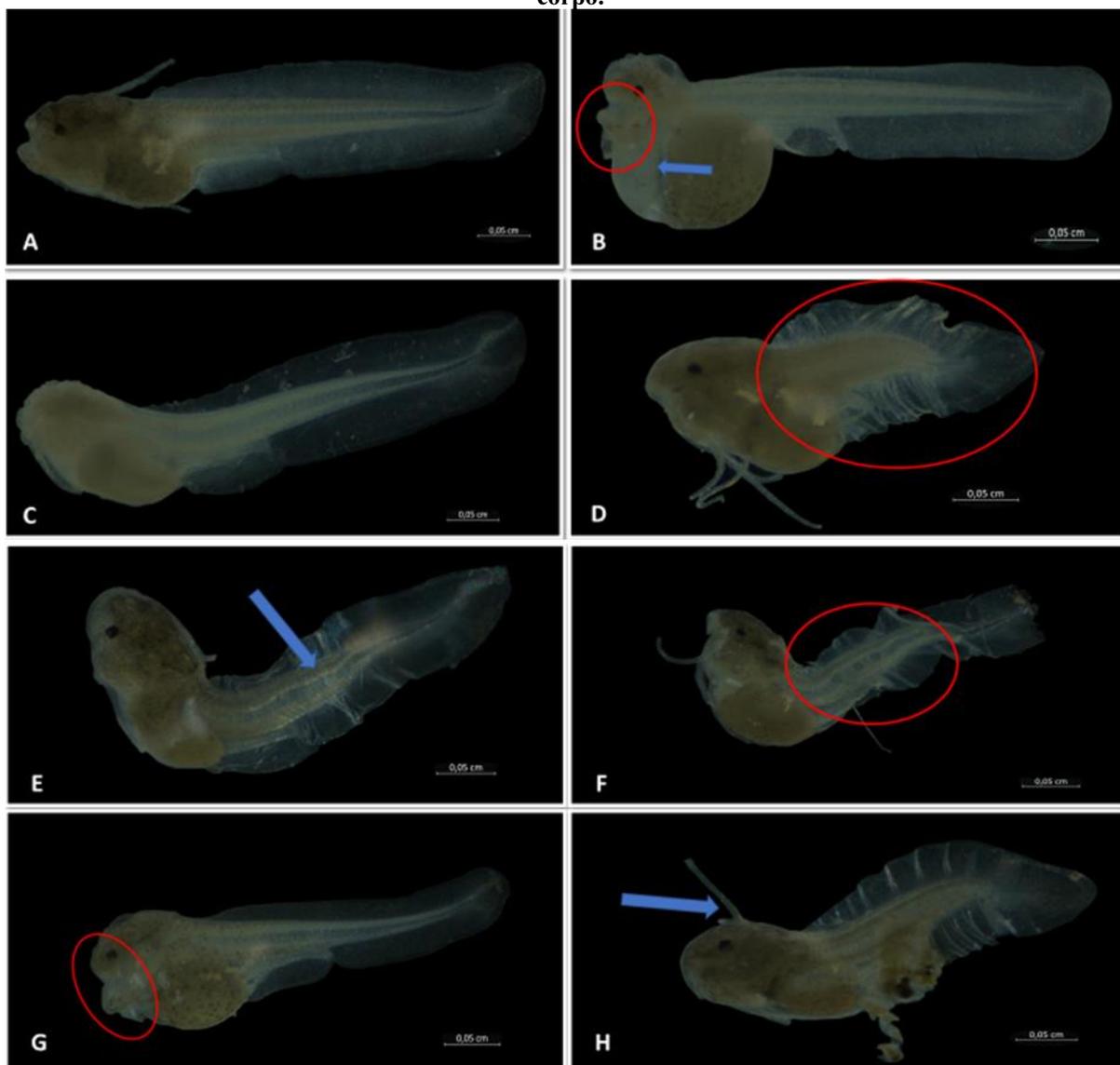
Os danos craniofaciais, a lordose, a atrofia corporal e as lesões nas nadadeiras foram as principais deformidades morfológicas observadas neste estudo (Figura 5). Além destas, observou-se casos de escoliose, edema pericárdico e redução ou ausência dos olhos.

Gráfico 1 – Taxa de eclosão (A) e frequência relativa da sobrevivência dos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 28, 48, 72 e 96 hpf (B). CTR = grupo controle normal; CTRV = grupo controle veículo; D1 – D6 = diluições de 1% a 0,031% do extrato de mamona. O título dos gráficos representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey



Fonte: Autoria própria (2020)

Fotografia 5 – Deformidade morfológicas em eleuterioembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48e 96 hpf. A) Indivíduo normal, sem anormalidades. B) Indivíduo com alterações crâniofaciais (círculo vermelho) e edema pericárdico (seta azul). C) Indivíduo albino com sinais de desnutrição. D) Indivíduo com atrofia corporal. E-F) Indivíduos com danos axiais: lordose e escoliose. G) Indivíduo com ausência de barbilhões, danos crâniofaciais (círculo vermelho) e leve encurtamento corporal. H) Indivíduo atrofiado com destaque ao barbilhão dobrado em direção à parte superior do corpo.



Fonte: Autoria própria (2020).

Dentre os grupos experimentais, apenas os indivíduos das diluições D4 (48hpf), D5 e D6 e os controles foram avaliados em relação às deformidades, devido a elevada taxa de mortalidade dos grupos D1, D2 e D3. A partir da ANOVA observou-se significância no índice de severidade em relação aos grupos experimentais, sendo que os indivíduos da diluição D5 foram, de modo geral, os que apresentaram os maiores valores de danos em 48 e 96 hpf.

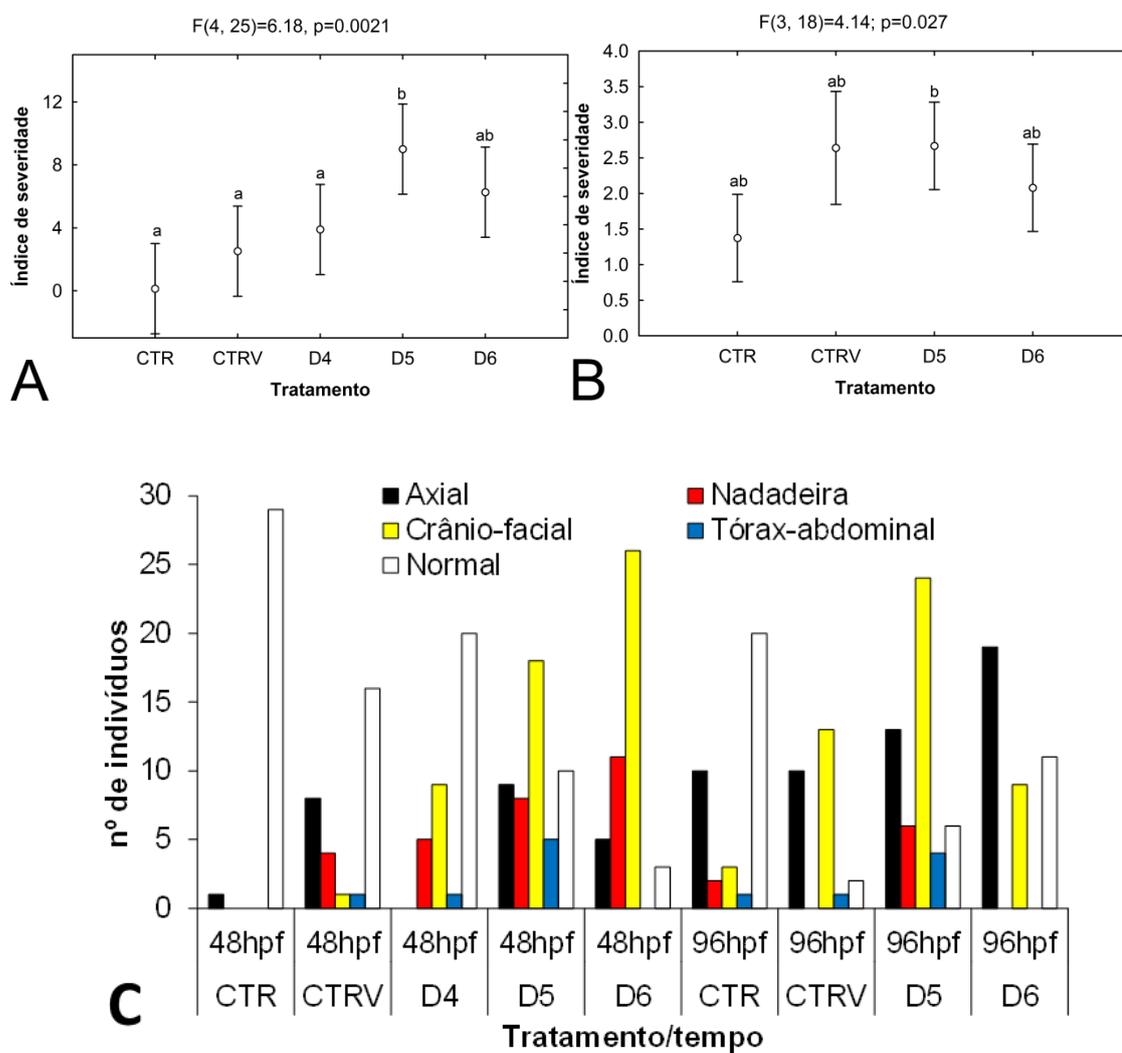
Ainda, constatou-se que os grupos CTRV e D6 apresentaram um incremento relevante na taxa de danos em 96 hpf, porém não suficiente para gerar significância em relação ao grupo CTR (Gráfico 2A-B).

Ao observar o quantitativo de indivíduos por categoria de danos constatou-se que, em 48 hpf, ocorreu um aumento progressivo dos danos craniofaciais e nas nadadeiras do grupo CTRV ao D6. Em 96 hpf, verificou-se um incremento de danos axiais do CTR ao D6 e um relevante desenvolvimento de danos craniofaciais. Considerando ambos os tempos de análise, verificou-se que, de modo geral, os indivíduos do grupo D5 desenvolveram uma quantidade maior de deformidades, seguida pelo grupo D6 e CTRV. Vale ressaltar que o grupo CTRV apresentou um relevante incremento sua taxa de danos, principalmente craniofaciais, em 96 hpf (Gráfico 2C). Os danos torácico-abdominais foram os que tiveram menor representatividade tanto em 48 quanto em 96 hpf.

4.3 Mobilidade

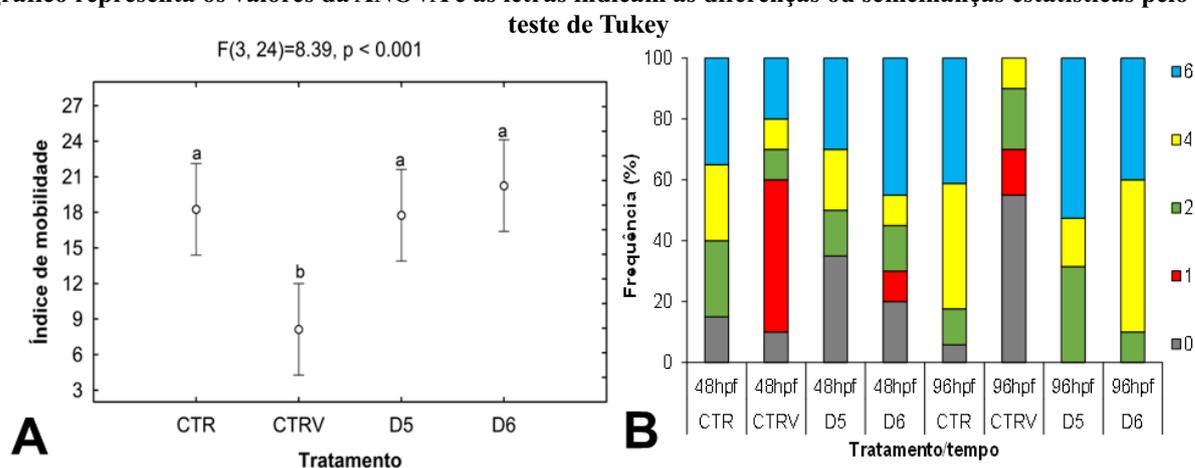
A mobilidade dos indivíduos se manteve estatisticamente igual nos grupos CTR, D5 e D6, sendo menor significativamente apenas no CTRV, em ambos os tempos de análise. Observando a frequência dos indivíduos nas diferentes categorias de mobilidade, verificou-se que o grupo CTRV teve maior representatividade de indivíduos imóveis ou trêmulos/sem equilíbrio (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Índice de severidade de danos morfológicos observados em *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* ao longo de 48 hpf (A) e 96 hpf (B), bem como o número de indivíduos por categoria de danos (C). CTR= controle; CTRV= controle veículo; D4–D6= diluições de 0,125% a 0,031% do extrato. O título dos gráficos representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey



Fonte: Autoria própria (2020)

Gráfico 3 – Índice de mobilidade (A) e frequência de indivíduos por categoria de mobilidade (B) dos eleuterioembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 e 96 hpf. 0 = nulo/morto. 1 = trêmulo/sem equilíbrio. 2= baixa mobilidade. 4= mobilidade moderada. 6= alta mobilidade. CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey

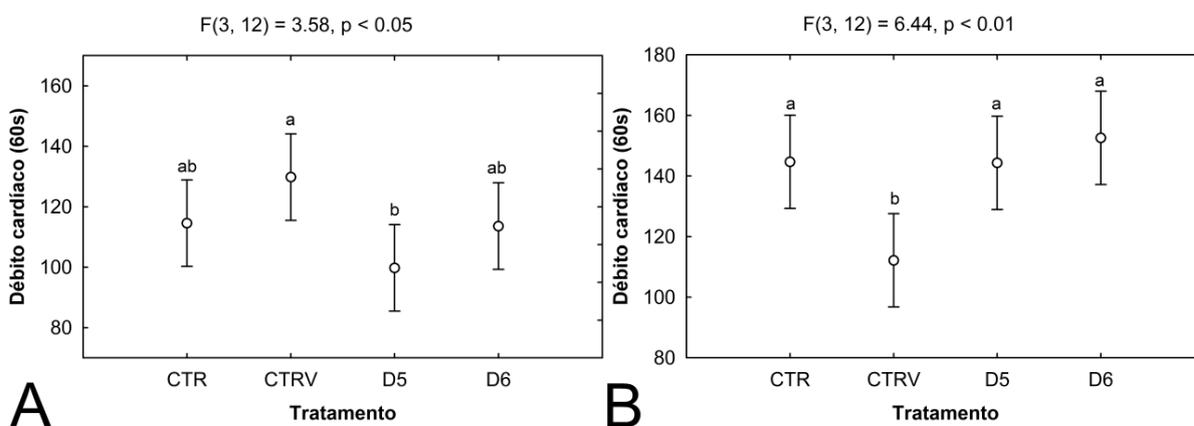


Fonte: Autoria própria (2020).

4.4 Débito cardíaco

O débito cardíaco em 48hpf foi significativamente menor nos eleuterioembriões do grupo D5, sendo semelhante nos demais (Gráfico 4A). Em 96 hpf, os batimentos cardíacos foram estatisticamente menores somente no grupo CTRV (Gráfico 4B).

Gráfico 4 – Débito cardíaco em eleuterioembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 hpf (A) e 96 hpf (B). CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores da ANOVA e as letras indicam as diferenças ou semelhanças estatísticas pelo teste de Tukey

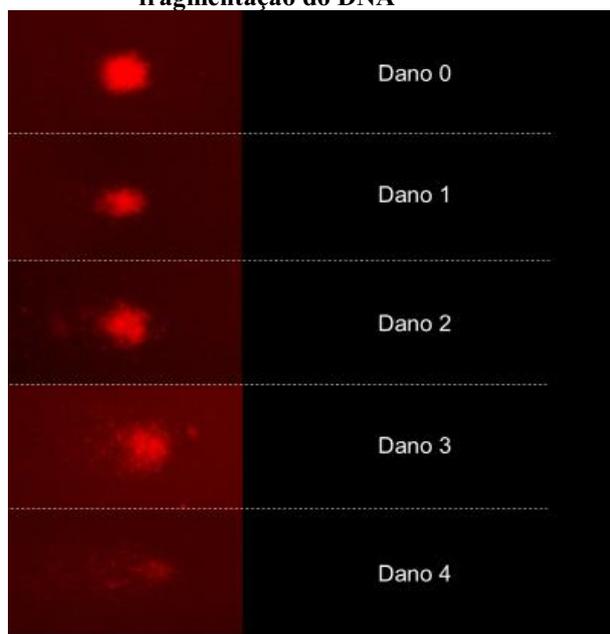


Fonte: Autoria própria (2020)

4.5 Ensaio cometa

As cinco categorias de nucleóides propostas no ensaio cometa foram observadas e registradas no presente estudo (Figura 6).

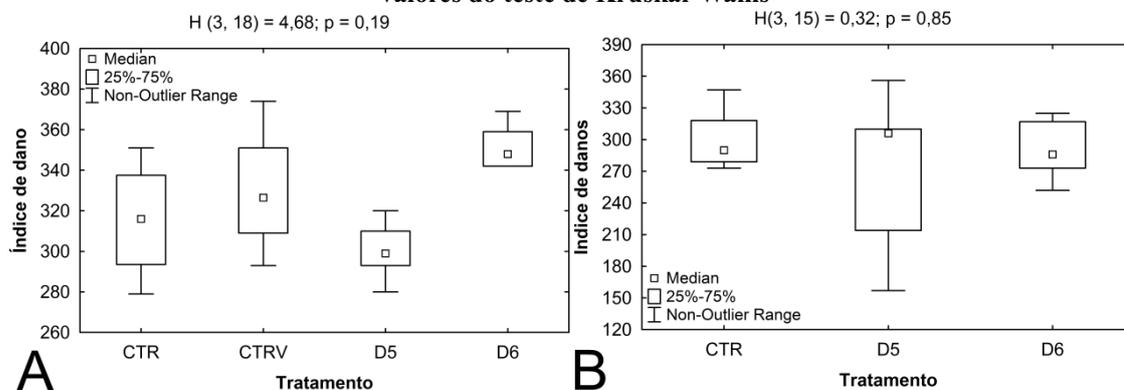
Fotografia 6 – Fotomicrografias dos nucleóides registrados nos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 e 96 hpf, nas diferentes categorias de classificação para o Ensaio Cometa. Dano 0 = nucleóide normal, sem fragmentação do DNA; Dano 1 a 4 = escala progressiva de fragmentação do DNA



Fonte: Autoria própria (2020)

A partir do teste de Kruskal-Wallis foi possível verificar que o índice de danos ao DNA se manteve similar nos diferentes tratamentos considerados (Gráfico 5), não apresentando significância estatísticas em nenhum dos tempos de análise (48 e 96 hpf).

Gráfico 5 – Índice de danos ao DNA, estabelecido pelos scores do Ensaio Cometa, nos eleuteroembriões de *R. quelen* expostos ao extrato hexânico de *R. communis* em 48 hpf (A) e 96 hpf (B). CTR= grupo controle; CTRV= controle veículo; D5–D6= diluições de 0,063 e 0,031% do extrato. O título do gráfico representa os valores do teste de Kruskal-Wallis



Fonte: Autoria própria (2020)

5 DISCUSSÃO

O extrato hexânico de *R. communis* (EHRC), em maiores concentrações causaram efeitos negativos a eleuteroembriões de *R. quelen*, demonstrando que estes organismos vertebrados, não-alvos e em fase inicial de desenvolvimento, são também suscetíveis aos compostos do extrato. Por outro lado, em menores concentrações, EHRC testado mostrou-se não letal ao organismo não-alvo, sugerindo uma faixa segura ou de menor risco para a prospecção de um produto inseticida alternativo, no caso o EHRC. Neste sentido, o trabalho contribui com os critérios de biossegurança no desenvolvimento de produtos inovadores na área agrônômica, de interesse socioeconômico, mas com responsabilidade ambiental.

O EHRC inviabilizou a eclosão de 100% dos embriões de *R. quelen* nas maiores concentrações (D1 e D2), de 99,5% em D3 e 33% em D4. Os sobreviventes desta última diluição foram reduzidos a cerca de 25% em 48 hpf e próximo a zero em 72 hpf, evidenciando também um elevado poder de letalidade. Segundo Rodrigues-Galdino (2010), a eclosão de *R. quelen* ocorre em torno de 25 hpf em temperatura aproximada de 24 °C. Desta forma, a avaliação da eclosão realizada neste trabalho em 28 hpf é considerada apropriada para observar efeitos como inibição, redução ou retardo no desenvolvimento. Segundo Brito et al. (2017), a taxa de eclosão de cerca de 80% nos grupos controle é considerada adequada para a espécie *R. quelen*, sugerindo condições favoráveis de saúde para os animais. Valores acima deste somente foram evidenciados no presente estudo nos grupos CTR, CTRV, D5 e D6.

Isso demonstra que EHRC no intervalo de diluição de 0,125 a 1% apresenta risco ao desenvolvimento das fases iniciais de peixes, como o jundiá, podendo comprometer a sua viabilidade populacional, por não recompor o efetivo de novos indivíduos no sistema, extrapolando para condições naturais. Como consequência, um declínio populacional seria esperado, bem como o aumento no risco de extinção das espécies em casos de contaminação prolongada. Isso certamente contrapõe as perspectivas iniciais de desenvolver um inseticida natural mais compatível com as prerrogativas do desenvolvimento sustentável.

Recentes pesquisas com outros extratos botânicos também têm relatado efeitos letais ou imobilização em larvas e/ou juvenis de peixes. Benovit (2012) avaliou os efeitos do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) sobre lavas de *R. quelen* e constatou atividade sedativa e anestésica nas concentrações de 90 mgL⁻¹ e de 300 a 900 mgL⁻¹, respectivamente. Hajek (2011) avaliou a exposição de *Ciprinus carpio* (carpa comum) ao óleo essencial de *Malaleuca alternifolia* e constatou que a concentração de 500 µLL⁻¹ elevou a mortalidade a partir de 45 min. de exposição.

No caso do EHRC, a literatura ainda é escassa quando se trata de avaliar o seu potencial toxicológico a organismos não-alvos, principalmente voltados aos vertebrados aquáticos, tal como o jundiá *R. quelen*. No entanto, existem alguns trabalhos que testaram extratos de *R. communis* sobre outros organismos não-alvos. Mandal (2010), por exemplo, observou efeitos negativos do extrato da mamona em fungos entomopatogênicos e sobre três espécies de mosquitos vetores de doenças, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes albopictus*, encontrando-se efeitos larvicidas com 100% de eficácia em concentrações de 32 e 64 µg/mL. Além destes, verificou-se que o extrato hexânico de mamona (EHRC) causou interferência reprodutiva e na emergência da microvespa parasitóide *Telenomus podisi*, que é utilizada no controle biológico de percevejos pragas (OLIVEIRA, 2020).

No presente estudo, somente as concentrações de 0,062 (D5) e 0,031% (D6) do extrato vegetal não foram letais para eleuteroembriões de *R. quelen*, indicando em um primeiro momento o seu maior potencial para prospecção, por atender a um dos principais critérios de biossegurança que é a baixa letalidade. A taxa de sobrevivência das larvas é crucial para entender o risco de exposição a produtos químicos em organismos aquáticos, uma vez que fornece uma ligação entre toxicidade e manutenção a longo prazo de populações naturais (CAIXETA *et al.*, 2016).

Os inseticidas naturais, de origem vegetal, podem vir a constituir-se em importantes

agentes de controle para insetos-praga, por serem de fácil obtenção e utilização, terem baixo custo e minimizarem os problemas apresentados pelos inseticidas químicos sintéticos (CARNEIRO *et al.*, 2007). Assim, a busca por novas alternativas de controle para insetos-praga, como a utilização de inseticidas botânicos, se torna indispensável. Uma das alternativas pode se voltar ao desenvolvimento de um produto a base do EHRC, que em altas concentrações apresentam efeito tóxico para organismos alvo, mas em baixas concentrações não promovam letalidade para os organismos não-alvos. Nesse contexto, Warmling, (2018) com caráter investigativo, propôs testar extratos botânicos hidroalcoólicos e frações purificadas sobre *C. includens* em condições de laboratório, visando identificar possíveis efeitos e compostos com ação inseticida e constatou que, o EHRC em concentração 2%, possuem potencial inseticida para o controle de *C. includens*, apresentando alto percentual de mortalidade.

Neste trabalho, altas concentrações apresentam efeito tóxico para o *R. quelen*, mas em baixas concentrações não promovem letalidade. Desta forma, observou-se que a avaliação toxicológica da exposição dos eleuteroembriões de *R. quelen* ao EHRC concorda com as argumentações de Kunle *et al.* (2012), que ressaltaram a importância de se estabelecer parâmetros de qualidade e segurança para a coleta, manuseio, processamento e produção de testes com extratos botânicos. Segundo os autores, isso implica em uma maior eficiência e confiabilidade no desenvolvimento da pesquisa e garante segurança dos extratos botânicos no mercado comercial. No mesmo sentido, Barros *et al.* (2018) consideraram primordial que extratos botânicos sejam avaliados em relação a sua segurança, eficácia e toxicidade dos produtos. Os autores ainda destacam que é importante desmistificar o conceito de que as plantas medicinais não conferem riscos à saúde, pois isso irá depender da forma com que é utilizada.

As questões de biossegurança podem contribuir para diminuir e prevenir os riscos para os manipuladores, consumidores ou organismos não-alvos que são encontrados nos ecossistemas. Também existe a necessidade de uma legislação efetiva para o controle da produção e consumo destes extratos, que inclusive fortalecerão a necessidade do uso de boas práticas em todas as etapas do processo produtivo (BRUNING, MOSEGUI; VIANNA, 2012; GRIBNER; RATTMANN; GOMES, 2019).

Ao se observar as deformidades morfológicas, notou-se que a diluição D5 apresentou uma maior propensão a anormalidades precoces, podendo resultar a longo prazo em um

incremento na mortalidade. Desta forma, sugere-se que seguindo o princípio da precaução a diluição de 0,031% seria a ideal para ser investigada e desenvolvida no intuito de buscar um controle alternativo mais sustentável, contudo se reconhece a necessidade de estudos crônicos e com outros organismos para sustentar esta afirmação.

Dentre as deformidades registradas, a categoria craniofacial se destacou nas diluições D5 e D6, embora o índice de severidade geral tenha apontado significância somente no grupo D5. Vale ressaltar que esta região apresenta os principais órgãos sensoriais do animal, tais como olhos e barbilhões. Este mecanismo sensorial permite ao animal a localização de presas e a fuga de predadores, podendo representar um risco futuro para a espécie, considerando uma situação *in natura*. Outras deformidades, tais como danos às nadadeiras, ao eixo corporal (lordose, cifose, atrofia corporal) e edema no pericárdio também denotam suscetibilidade, aumentando as chances de morte precoce dos indivíduos.

O extrato botânico de mamona contém ácido siríngico e rutina, os quais possuem principalmente alcalóides, fenóis e flavonoides em sua composição (WARMLING, 2018). Estes compostos apresentam potencial inseticida e são os prováveis desencadeadores de anormalidades em vertebrados. Os alcaloides, por exemplo, em baixas concentrações podem bloquear vias metabólicas (WINK, 2000), lesionar o DNA, interromper a síntese proteica e consequentemente causar a morte celular (BERTHOLDO-VARGAS E CARLINI, 2008), além de afetar receptores de acetilcolina no sistema nervoso ou canais de sódio da membrana das células nervosas (RATTAN, 2010).

O alcaloide comumente encontrado nas folhas e sementes de *R. communis* é a ricina, o qual apresenta efeito inseticida letal para diversos organismos alvo (LEITE *et al.*, 2005) RONDELLI, 2010; LIMA *et al.*, 2011), além de efeitos subletais como retardo no crescimento larval de lagartas, diminuição do peso de pupas e inibição do desenvolvimento (RIZWAN-UL-HAQ *et al.*, 2009), o que sugere efeitos diretos no processo de morfogênese, podendo resultar em malformações diversas. Já os flavonoides são facilmente encontrados nos frutos, apresentando sensação cáustica e sabor picante, características que justificam sua atividade inseticida (SIMÕES *et al.*, 2004; OLIVEIRA; AKISUE, 2005). Além disso apresentam ação tóxica em insetos (SCHOONHOVEN; LOON; DICKE, 2005), causando-lhes alterações fisiológicas negativas, como inibição no processo de muda larva-larva e larva-pupa verificado em *Anticarsia gemmatalis* após a ingestão de rutina e genistina (CRUZ; BOLDRINI; SALLES, 2011).

Dos marcadores fisiológicos e comportamentais utilizados, verificou-se que a mobilidade dos indivíduos expostos ao EHRC nas diluições D5 e D6 se manteve próxima da observada no grupo CTR, tendo um leve incremento com o passar do tempo (de 48 para 96 hpf). Esse aumento da mobilidade em 96 hpf foi considerado normal, visto que os eleuteroembriões estão em plena atividade metabólica, com ganho de comprimento e biomassa. A velocidade de natação depende primordialmente do impulso da cauda, tendo também uma coparticipação do bombeamento de água pelas brânquias. Através da exalação de água presente nesses órgãos, os indivíduos são capazes de criar fluxos de massa de água que auxiliam na propulsão (BIZZOTTO, 2006). Em caso de intoxicação por EHRC o qual apresenta propriedades anticolinesterásicas, seria esperado que a natação estivesse comprometida, causando aos eleuteroembriões dificuldades na movimentação. A não observação deste cenário sugere que as concentrações D5 e D6 foram atóxicas para o comportamento natatório.

O débito cardíaco nos grupos D5 e D6 também se manteve similar ao CTR, exceto o D5 em 48 hpf. Essa redução precoce no número de batimentos não se correlacionou com a mobilidade, mas sim com as anormalidades morfológicas. É importante ressaltar que a mobilidade (48 e 96 hpf) e o débito cardíaco (96 hpf) apresentaram uma redução significativa nos indivíduos do grupo CTRV, o qual apresentou 2,5% de DMSO. Plummer *et al.* (1983) e Barbosa *et al.* (2018), ao avaliarem os efeitos do DMSO sobre tecidos de moluscos e vertebrados, concluíram que este solvente é um inibidor no funcionamento da acetilcolinesterase (AChE) em tecido nervoso e no músculo. Diante disso, a utilização deste solvente, com efeito neurotóxico, em bioensaios somente é recomendada a partir de uma avaliação rigorosa da sua potencial interação com o organismo alvo e quando em baixas concentrações (BARBOSA *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos apontam efeito anticolinesterásico agudo em peixes e ratos em concentrações superiores a 1,0% de DMSO (PLUMMER *et al.*, 1983; WATTS E HOOGMOED, 1984). Em outros casos, consideram o DMSO de baixa toxicidade e, por esta razão, popularizou-se tanto seu uso na diluição de substâncias oleaginosas, que na maioria das vezes sua concentração nem é mencionada (GALVÃO *et al.*, 2017).

O fato é que no presente trabalho diversos testes foram realizados para a diluição do EHRC e incontáveis insucessos registrados, até que a concentração de 2,5% foi factível, porém com um efeito evidente sobre o débito cardíaco e a mobilidade.

Por fim, não foram observados efeitos na taxa de quebra da fita de DNA por meio do ensaio cometa, como seria esperado caso houvesse aumento no ambiente oxidativo das células (DE ARCAUTE *et al.*, 2016). O curto tempo de exposição (ensaio agudo), as baixas concentrações testadas e os próprios mecanismos de reparo do DNA, conservados evolutivamente para serem expressos desde a primeira célula do organismo, foram provavelmente fatores relacionados à ausência de efeito sobre esse biomarcador. No entanto, estudos de longo prazo são sugeridos e encorajados, visto que outros parâmetros como as deformidades e o débito apresentaram resultados sugestivos, mesmo em baixas concentrações (D5 e D6).

Este estudo foi essencial para corroborar com outros estudos que foram e ainda irão ser desenvolvidos. Vale ressaltar que o estudo realizado por Warmling, (2018) contribuiu para o entendimento e desenvolvimento da nossa pesquisa. O referido autor verificou que a concentração de 2% do EHRC foi a que causou maior efeito letal, pois apresentou implicação inseticida sobre a lagarta *Chrysodeixis includens* em condições de laboratório, sendo que a CL₅₀ de EHRC causou 75% de mortalidade. A partir deste estudo foi escolhida em uma espécie não-alvo e proposto um protocolo para o desenvolvimento de nosso trabalho. Diante dos resultados é possível perceber que altas concentração do EHRC nas diluições de 0,12 a 1% (abaixo de 2%) tem um potencial de risco para organismos não-alvos também testados em laboratório.

A grande pergunta está relacionada aos impactos negativos que o EHRC pode causar na natureza. Precisamos de uma investigação para verificar se o EHRC em contato com o ambiente natural é ou não biodegradável. Ainda não temos estudos que comprovem este potencial, por ser um estudo recente que vem ganhando espaço na pesquisa. Uma sugestão, é realizar estudos sobre outros organismos vivos, de preferência que se encaixem dentro dos vertebrados e que também sejam não -alvos.

6 CONCLUSÕES

Os eleuteroembriões de *R. quelen* apresentaram elevada vulnerabilidade ao extrato hexânico de *R. communis* nas diluições de 0,12 a 1%, podendo implicar em risco a sua viabilidade populacional caso a substância seja produzida e lançada no ambiente nestas concentrações e formulação aqui utilizada.

As concentrações D5 e D6 apresentam maior potencial para prospecção de um novo produto agrônomico fitossanitário, pois foram *a priori* de baixa toxicidade ou atóxicas para os eleuteroembriões de *R. quelen*, embora alguns dados evidenciem a elevação nas deformidades morfológicas e uma diminuição no débito cardíaco para os animais do grupo D5. Essa questão claramente precisa ser melhor investigada, inclusive no desenvolvimento de diferentes formulações do extrato, de modo a torna-lo mais seguro.

Um novo protocolo de solubilização deve ser implementado para a utilização do extrato botânico em experimentos aquáticos, pois as elevadas concentrações de DMSO prejudicaram os parâmetros comportamentais e fisiológicos aqui testados.

É de extrema importância que estudos complementares sejam realizados com este organismo não-alvo ou outras espécies, buscando testes a longo prazo e a incorporação de biomarcadores que possibilitem uma melhor compreensão da interação EHRC-sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14724**: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos. 3ª ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15499**: Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração: método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ADORJAN, B., BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 407–426, 2010.
- ALMEIDA, I.P.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C.; FREIRE, R.M.M.; GUEDES, M.A. Armazenamento de feijão macassar tratado com mamona: estudo da prevenção do *Callosobruchus maculatus* e das alterações nutricionais do grão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 133- 140, 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA**: Monitoramento do mercado de agrotóxicos: observatório da indústria de agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 abr. 2020
- AGRICULTURA ORGÂNICA**: introdução às normas, regulamentos e critérios para acesso aos mercados dos orgânicos no Brasil. Niterói: Programa Rio Rural, 2009. ISSN: 1983-5671. Disponível em: <<http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/19%20Agricultura%20Organica.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2020.
- ARCAUTE, C.R. *et al.* Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 632-639, 2014.
- ARAÚJO, S.A.C. *et al.* Usos Potenciais de *Melia azedarach* L. (Meliaceae): um levantamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 141–148, 2009.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 838-844, 2011.
- AZAPAGIC, A.; PERDAN, S. Sustainable chemical engineering: dealing with wicked sustainability problems. **AIChE Journal**, v. 60 n. 12, p. 3998–4007, 2014.
- BARROS, E. M. *et al.* Short-term toxicity of insecticides residues to key predators and

parasitoids for pest management in cotton. **Phytoparasitica**, v. 46, n. 3, p.391- 404, 2018.

BARBOSA, F.R. *et al.* Eficiência e seletividade de inseticidas no controle do psíldeo (*Triozoida* sp.), em goiabeira. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p.45-52, 2001.

BARBOSA, K. F. S.; OLIVEIRA, E. N.; MACHADO, R. N.; GOMES, A. L. S.; PAXIÚBA, W. D. DMSO (dimetil sulfóxido) inibe acetilcolinesterase dos tecidos nervoso e muscular de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2018.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BELANGER, S.E.; BALON, E.K.; RAWLINGS, J.M. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 88–95, 2010.

BENOVIT, S.C. *et al.* Anesthesia and transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, whit assential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, p. 896-900, 2012.

BENOVIT, S.C. **Composition, sedative and anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) troncoso (Verbenaceae) in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

BERTHOLDO, V. L.R. **Efeito inseticida de proteínas inativadoras de ribossomo tipo 1 e do Jaburetox-2EC em lepidópteros**. 2008. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BIZZOTTO, P. M. **Trânsito de peixes na escada da UHE-Igarapava, Rio Grande, Alto Paraná**. 2006. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

BOZZO, F.R. *et al.* Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 302-308, 2007.

BRASIL. **Lei nº 7.802 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. Brasília: Casa Civil, 1989.

BRITO, I.A.A.; LÓPEZ-BARRERA, E.A.; ARAUJO, S.B.L; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to

wastewater. **Ecological Modelling**, v. 347, p. 40–49, 2017.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

CABEL, J. F.; OELOFSE, M. An indicator framework for assessing agroecosystem resilience. **Ecology and Society**, v. 17, n. 1, p. 13, 2012.

CAIXETA, E.S.; SILVA, C.F.; SANTOS, V.S.; CAMPOS JÚNIOR, O.E.; PEREIRA, B.B. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for *Aedes aegypti* control in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 79, p. 799–803, 2016.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M. E. C.; GOMES, J. C. Effectiveness of neem extracts in controlling the powdery mildew of bean plant. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CELESTINO, F. N. **Potencial do óleo de mamona e associação com *Beauveria bassiana* (BALS.) vuillemin visando o manejo da broca-do-café**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2011.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n.3, p. 249-61, 2004.

CONCEIÇÃO, G. M. *et al.* Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2012.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNHA, G. H. M.; ROCHA, U. R.; OLIVEIRA, A. B. Economia da mamona: uma visão do mercado brasileiro no início do século XXI. **Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2017.

CUNHA, U.S.; VENDRAMIM, J.D.; ROCHA, W.C.; VIEIRA, P.C. Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, n. 11, p. 1579-1585, 2006.

CRUZ, P. V.; BOLDRINI, R.; SALLES, F.F. *Apobaetis day* (Ephemeroptera: Baetidae) from Northern Brazil: description of a new species and of the male imago of *A. fuzai* Salles & Lugo-Ortiz. **Aquatic Insects**, v. 33, p. 81–90, 2011.

DANTAS, P. C. *et al.* Toxicidade de extratos vegetais em *Coccidophilus citricola* (Brèthes, 1905) (Coleoptera: Coccinellidae). **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 3, p. 2060–

2067, 2019.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 2009.

DEQUECH, S. T. B. *et al.* Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 551-554, 2009.

DOMINGUES, I. *et al.* Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 152, p. 338-345, 2010.

EMBRY, M.R. *et al.* The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 79-87, 2010.

FARIAS, A. M. **Bioatividade do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith. 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FOLLE, N.M.T. *et al.* Low concentration of 2,4,6-tribromophenol (TBP) represent a risk to the population of South American silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.187, 109815, 2020.

FRANCISCO, P. R. M. *et al.* Aptidão Climática da Mamona (*Ricinus communis* L.) para o Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 3, p. 737–752, 2016.

GAHUKAR, R. T. A review of castor-derived products used in crop and seed protection. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 5, p.655-666, 2017.

GALVAO, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317- 1330, 2017.

GHASEMZADEH, J., SINAEI, M., BOLOUKI, M. Biochemical and histological changes in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*) exposed to diazinon. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, p. 164-170, 2015.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. *et al.* In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* Larvae (Diptera, Tephritidae). **Interciencia**, Venezuela, v. 37, n. 4, p. 284-289, 2012.

GOULART, H. F. *et al.* Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1205–1224, 2015.

GRIBNER, C.; RATTMANN, Y. D.; GOMES, E. C. Fitoterápicos na Atenção Básica à Saúde: uma Experiência na Região Sul do Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 2, p. 4-16, 2019.

HAJEK, G. J., The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 296-300, 2011.

HAMADA, N. **Ensaio de toxicidade empregados na avaliação de efeitos no sistema de tratamento de esgotos e efluentes, ETE Suzano, e seu entorno, utilizando organismos aquáticos**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HECHT, S. B. A evolução do pensamento agroecológico. *In*: ALTIERI, M. A. (Ed.). **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Agropecuária; AS-PTA, 2002. p. 21-51.

HEUSDEN, E. C. H. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. **Blumea**, v. 7, p.1-218, 1992.

HOLTZ, A. M. *et al.* Ação de plantas por meio de infoquímicos sobre o segundo e terceiro níveis tróficos. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 53-60, 2004.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Posicionamento do instituto nacional de câncer Jose Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. **Nota técnica nº 10**. Brasília: INCA, 2015. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/posicionamento-do-inca-acerca-dos-agrotoxicos>. Acesso em: 27 fev. 2020.

ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides? **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1587–1590, 2015.

KARIÑHO-BETANCOURT, E. Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: Ecological and evolutionary perspectives. **Botanical Sciences**, v. 96, n. 1, p. 35–51, 2018.

KESETYANINGSIH, T. W. Efficacy of *Annona squamosa* leaf extract as an insecticide against Cockroach (*Periplaneta americana*). *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE: RESEARCH AND APPLICATION ON TRADITIONAL COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE IN HEALTH CARE, 6, 2012, Surakarta. **Anais [...] Surakarta: Indonésia**, 2012. p. 152-156.

KLOCKE, J.A. Natural plant compounds useful in insect control. *In*: WALLER, G. R. (org.).

Allelochemicals: role in agriculture and forestry. Washington: American Chemical Society, 1987. p.396-415.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012.

LAMMER, E. *et al.* Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LEITE, A.C.; FERNANDES, J.B.; CABRA, E.C.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LIMA JÚNIOR, A.F. **Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Anthoscelides obtectus* e *Sitophilus* sp.** 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LOPEZ-FERBER, M. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 1-19, 2015.

LOZANO, E. R.; POTRICH, M.; BATTISTI, L. Insetos-praga que atacam a soja no cultivo orgânico. *In:* MAZARO, S. M. *et al.* (org.). **Sistema de produção: soja orgânica**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2017.

MACPHAIL, R.C. *et al.* Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v. 30. p. 52–58, 2009.

MANDAL, S. Exploration of larvicidal and adult emergence inhibition activities of *Ricinus communis* seed extract against three potential mosquito vectors in Kolkata, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 8, p. 605-609, 2010.

MARAGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MAZZOLENI, E. M.; NOGUEIRA, J. M. Agricultura orgânica: características básicas do seu produtor. **Revista de Economia e Sociologia Rural - RER**, v. 44, n. 2, p. 263-293, 2006.

MEIRELLES, L. Soberania alimentar, agroecologia e mercados locais. **Revista Agriculturas: experiências em agroecologia**, v. 1, p. 11-14, 2004.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito

ou realidade. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

NAVOLAR, T. S.; RIGON, S. A.; PHILIPPI, J. M. S. Diálogo entre agroecologia e promoção da saúde. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 23, n. 1, p. 69-79, 2010.

NEVES, T.E. *et al.* Efeito larvicida de *Ricinus communis* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18 n. 1, p. 127-131, 2014.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. A agroecologia: estratégias de pesquisa e valores. **Estudos Avançados**, v. 29, n. 83, p. 183-207, 2015.

NOVELLI, A. *et al.* Chemosphere impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408-1414, 2016.

ODUM, E. P. **Ecologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007. 438 p.

OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Publishing, Paris, 2019. p. 02-24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en> Acesso em: 02 jan. 2020

OLIVEIRA, D. H. R. **O extrato hexânico de *Ricinus communis* é seletivo a *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Platygasteridae)?** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias I) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

OLIVEIRA, T. G.; FAVARETO, A. P. A.; ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no Oeste Paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 375-390. 2013. Disponível em: http://amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/684. Acesso em: 04 abr. 2020.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 178p

PARRA, J. E. G. *et al.* Alimentação de fêmeas de Jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2011-2017, 2008.

PEREIRA, M. M.; ESTRONCA, T. M. R.; NUNES, R. M. D. R. **Guia de segurança no Laboratório de Química**. 2. ed. Lisboa: FCTUC, 2006. 50 p.

PENTEADO, S. R. **Introdução à Agricultura Orgânica: Normas e técnicas de cultivo**. Campinas: Editora Grafimagem, 2000. 110p.

PENTEADO, S.R. **Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável**. 4. ed. Campinas, SP: Via Orgânica, 2010. 172 p.

- PÉRES, V.F. *et al.* Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes: fatty acids and vitamin e from piper gaudichaudianum kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 115–118, 2006.
- PESSOA, A.S. *et al.* *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 329-334, 2014.
- PIRIZ, M. A. *et al.* Uso de plantas medicinais: impactos e perspectivas. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 992-999, 2013.
- PLUMMER, J. M.; GREENBERG, M. J.; LEHMAN, H. K.; WATTS, J. A. Competitive inhibition by dimethylsulfoxide of molluscan and vertebrate acetylcholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 1983.
- POWERS, C.M.; SLOTKIN, T.A.; SEIDLER, F.J.; BADIREDDY, A.R.; PADILLA, S. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, p. 708-714, 2011.
- QUINN G.; KEOUGH M. **Experimental design and data analysis for biologists**. New York, Cambridge University Press. 2002.
- RAGASSI, B.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P.; SILVA JR, O. P. Ecotoxicidade de agrotóxicos para algas de água doce. **Revista ANAP Brasil**, v. 10, n. 19 p. 45-55. 2017.
- RATTAN, R. S. “Mechanism of Action of Insecticidal Secondary Metabolites of Plant Origin.” **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, 2010.
- RIZZI B.; SILVA G.; MAIOR T. S. Mamona como combustível. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 1, p. 317-320, 2010.
- RIZWAN-UL-HAQ, M.; HU, Q.B.; HU, M.Y.; LIN, Q.S.; ZHANG, W.L. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Pest Science**, v. 82, p. 327-334, 2009.
- RODRIGUES-GALDINO *et al.* Desenvolvimento do bagre neotropical *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubado em diferentes regimes de temperatura. **Zygote**, v. 18, p. 131-144 , 2010.
- RONDELLI, V. **Desempenho do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e do óleo de mamona para o controle de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- SAITO, M. L. *et al.* Avaliação de plantas com atividade de detergente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH) e *Anticarsia gemmatalis* HUBNER. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 1-10, 2004.

SANTANA, L. M. B.; CAVALCANTE, R. M. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixe: uma revisão. **The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 257 – 268, 2016.

SANTANA, L.L.; SILVA, A. C. A. Os Riscos do Uso de Plantas Medicinais Durante o Período Gestacional. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 26, n. 3, p. 118-125, 2018.

SANTANA, M. D. O *et al.* O Poder das Plantas Medicinais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de idosas. **Multidebates**, v. 2, n. 2, p. 10-27, 2018.

SANTIAGO, P.S. *et al.* Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, H. O. *et al.* Eficiência do extrato aquoso de folhas de mamona (*Ricinus communis* L.) sobre ovos e ninfas de quinto instar do predador *Podisus nigrispinus dallas* (Pentatomidae). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5, 2008, Lavras. Cesumar (**Anais...**) **VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**. Lavras: 2008.

SCHOONHOVEN, L.M.; LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. 2 ed. New York: Oxford. 2005. 421p.

SIEGWART, M. *et al.* Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46-58, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal component analysis in the software assistat-statistical attendance. *In*: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, Reno-EUA. **Anais [...]** Reno: American Society of Agricultural & Biological Engineers, 2009.

SILVA, P. H. S. *et al.* Eficiência de doses do óleo essencial de *Piper tuberculatum* JACQ sobre adultos do pulgão-preto-do-feijão-caupi *Aphis craccivora* KOCH. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 3, 2013, Recife. **Anais [...]** Recife: IPA, 2013.

SILVA, C.P. *et al.* Effects of different filtration techniques on quality and toxicology of post treatment effluent from an anaerobic reactor. **Science of the Total Environment**, v. 723 138030, 2020.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46-58, 2013.

- SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, 2004. 1102p.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: Interscience Publication, 1997. 765 p.
- SOBJAK, T.M. *et al.* Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p. 267–275, 2017.
- SOUJANYA, P. L. *et al.* Potentiality of botanical agents for the management of post-harvest insects of maize: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2169–2184, 2016.
- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 83-87, 2005.
- SOUSA, A.; SANTOS, A.; ROCHA, R. Plantas Medicinais em Enfermagem: Os Saberes Populares e o Conhecimento Científico. **Revista Eletrônica Extensão em Debate**, v. 6, n. 1, p. 48-67, 2019.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 113, p. 203-212, 1999.
- SUN, Y.J.; LIU, Z.; WANG, J. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from iris tectorum Maxim. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 49–54, 2011.
- SUN, Y.J. *et al.* **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 654- 661, 2010.
- VAZQUEZ, M.M.P.; VAZQUEZ, P.P.; GALERA, M.M.; MORENO, A.U. Comparison of two ionic liquid dispersive liquid e liquid microextraction approaches for the determination of benzoylurea insecticides in wastewater using liquid chroma- tography e quadrupole-linear ion trap e mass spectrometry: evaluation of green parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 1356, p. 1-9, 2014.
- VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Documento nº316: Embrapa clima temperado. Pelotas: EMBRAPA, 2010. p. 7-15.**
- WARMLING, J. V. **Efeitos letais e subletais de extratos vegetais alcoólicos sobre *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias I) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.

WATTS, J. A.; HOOGMOED, R. P. Dimethyl sulfoxide: inhibition of acetylcholinesterase in the mammalian heart. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 365-369, 1984.

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture**: statistics and emerging trends. Bonn, Germany: International Federation of Organic Agriculture Movements (FiBL) and Research Institute of Organic Agriculture (IFOAM), 2017. Disponível em: <https://shop.fibl.org/CHen/mwdownloads/download/link/id/785/?ref=1>. Acesso em: 04 abr. 2020.

WINK, M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 3-122, 2000.

WOYNAROVICH, E. & L. HORVÁTH. **A propagação artificial de peixes tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO/Codevasf/CNPq, 1983. 220p.

ZHANG, G.; HE, L.; HU, M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 18– 25, 2011.