

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS TRENTIN LARENTIS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATOS DE ERVA-MATE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE GALINHA-DOMÉSTICA**

DOIS VIZINHOS

2021

LUCAS TRENTIN LARENTIS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATOS DE ERVA-MATE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE GALINHA-DOMÉSTICA**

**Assessment of the effects of yerba mate extracts on the early embryonic
development of domestic chicken**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Licenciado em Ciências Biológicas da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientadora: Patricia Franchi de Freitas

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

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.

LUCAS TRENTIN LARENTIS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATOS DE ERVA-MATE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE GALINHA-DOMÉSTICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Licenciado em Ciências Biológicas da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 07 de dezembro de 2021.

Patricia Franchi de Freitas
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Fernando Carlos de Sousa
Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Lilian de Souza Vismara
Doutora em Agronomia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS

2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nadia Trentin e Gilmar Larentis, pelo esforço, apoio e dedicação durante todos esses anos: amo vocês. Da mesma forma, aos meus avós maternos, Mario Luiz Trentin e Santina Menegat Trentin, e paternos, Gessi Larentis e Derci Rafael Larentis (*in memoriam*).

À profa. Patricia Franchi de Freitas, querida orientadora, pelas conversas, caronas, ensinamentos e, principalmente, por ser minha amiga. Obrigadão!

Ao meu grande amigo e parceiro de laboratório, Jean da Silva Amancio, por toda a ajuda na realização dos experimentos.

Ao prof. Eleandro José Brun, pela autorização concedida à coleta da erva-mate de uma área cultivada no câmpus Dois Vizinhos da UTFPR.

À profa. Daniela Aparecida Estevan, pela ajuda na identificação da espécie e pela disponibilização de alguns de seus livros.

À profa. Lilian Regina Rothe Mayer e aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, especialmente ao técnico Juliano Zanela, pela concessão de uso e ajuda com o moinho de facas.

À empresa ervateira e aos seus representantes pela doação da erva-mate comercial usada no ensaio experimental.

Ao técnico Thiago Cacção Villa, pela ajuda durante o preparo dos extratos.

À profa. Lilian de Souza Vismara, pelo apoio estatisticamente significativo com a metodologia estatística.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico, à profa. Michele Potrich e à profa. Maria Antonia Michels de Souza.

Aos amigos que conheci durante este tempo, pela convivência e amizade.

Aos membros da banca examinadora pelas suas valiosas sugestões.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Dois Vizinhos, pela concessão do espaço e de parte dos insumos necessários à realização do estudo.

Por fim, a todos os meus professores, pelos preciosos incentivos à minha formação acadêmica.

*O homem em sua arrogância se considera uma grande obra,
digna da interposição de uma divindade;
[seria] mais humilde e acredito mais verdadeiro
considerá-lo criado a partir de animais¹*

Charles Robert Darwin (1809-1882)

¹ Tradução a partir do original (cf. DE BEER, 1960, p. 106).

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma planta nativa da América do Sul, usada no preparo de diferentes bebidas tradicionais. Sua composição química inclui polifenóis, alcaloides, saponinas, vitaminas e minerais. Esta variabilidade fitoquímica está diretamente relacionada aos benefícios terapêuticos associados ao consumo de erva-mate. Dentre outros efeitos, os extratos de *I. paraguariensis* apresentam propriedades antimicrobianas, antiparasitária e anti-inflamatória. Estudos acerca da toxicidade da planta são escassos e apresentam resultados conflitantes. Poucos trabalhos analisaram a ação direta da erva-mate sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados. Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar se extratos aquosos de erva-mate bruta e comercial apresentam efeitos tóxicos ao desenvolvimento embrionário animal, usando a galinha-doméstica como modelo experimental. Este organismo-modelo foi escolhido por conta das suas várias vantagens, como o curto tempo de desenvolvimento e a independência do ambiente externo e do organismo materno para se desenvolver. A erva-mate bruta foi preparada com material colhido de uma área cultivada e processado em laboratório, enquanto que a erva-mate comercial passou pelo processamento industrial comum. Os extratos foram preparados com água destilada a 70°C, filtrados e esterilizados em autoclave. Ovos férteis de galinha-doméstica foram injetados com aproximadamente 100 µL de cada extrato (30 g/L), através da câmara de ar. O grupo controle não recebeu tratamento. Depois de três dias de incubação, procedeu-se à abertura e verificação da viabilidade dos ovos. Os embriões vivos foram submetidos à eutanásia e, em seguida, coletados e montados em lâminas permanentes através da técnica da montagem total. As análises estatísticas foram realizadas através do programa RStudio, em linguagem R. Dados com distribuição binomial e distribuição de Poisson foram analisados pelo teste de Tukey, usando o modelo linear generalizado, e os dados referentes aos estágios de desenvolvimento embrionário foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Não foram observados efeitos estatisticamente significativos sobre os parâmetros viabilidade dos ovos, sobrevivência embrionária e ocorrência de malformações. Contudo, verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à frequência cardíaca e entre os estágios de desenvolvimento dos embriões. Supõe-se que esses efeitos tenham relação com os compostos químicos presentes nos extratos. Todavia, os mecanismos envolvidos ainda precisam ser compreendidos. Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos para avaliar o potencial tóxico da erva-mate a nível molecular, celular e sistêmico, através de métodos mais específicos e usando outros modelos experimentais.

Palavras-chave: erva-mate; galinhas; embriologia; vertebrados.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) is a plant native to South America, used in the preparation of different traditional beverages. Its chemical composition includes polyphenols, alkaloids, saponins, vitamins and minerals. This phytochemical variability is directly related to the therapeutic benefits associated with yerba mate consumption. Among other effects, *I. paraguariensis* extracts have antimicrobial, antiparasitic and anti-inflammatory properties. Studies on the toxicity of the plant are scarce and show conflicting results. Few studies have analyzed the direct action of yerba mate on the embryonic development of vertebrates. Thus, the aim of this study was to evaluate whether aqueous extracts of raw and commercial yerba mate have toxic effects on animal embryonic development, using the domestic chicken as an experimental model. This model organism was chosen because of its several advantages, such as the short development time and independence from the external environment and the maternal organism to develop. Raw yerba mate was prepared with material collected from a cultivated area and processed in the laboratory, while commercial yerba mate underwent common industrial processing. The extracts were prepared with distilled water at 70°C, filtered and sterilized in an autoclave. Fertile chicken eggs were injected with approximately 100 µL of each extract (30 g/L), through the air chamber. The control group received no treatment. After three days of incubation, the eggs were opened and checked for viability. Alive embryos were euthanized and then collected and mounted on permanent slides using the whole-mount technique. Statistical analyzes were performed using the RStudio software, in R programming language. Data with binomial distribution and Poisson distribution were analyzed using the Tukey test, using the generalized linear model, and data referring to the stages of embryonic development were submitted to the Kruskal-Wallis test. No statistically significant effects were observed on the parameters of egg viability, embryonic survival and malformations occurrence. However, there were significant differences ($p < 0.05$) in relation to heart rate and among developmental stages of the embryos. These effects are supposed to be related to the chemical compounds present in the extracts. However, the mechanisms involved still need to be understood. It is suggested that further studies be conducted to assess the toxic potential of yerba mate at molecular, cellular and systemic levels, through more specific methods and using other experimental models.

Keywords: mate plant; chickens; embryology; vertebrates.

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
°C	Grau Celsius
%	Por cento (× 0,01)
<i>p</i>	Probabilidade de significância (valor-p)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Erva-mate	11
2.1.1	Breve resgate histórico-cultural	13
2.1.2	Composição química e propriedades biológicas	15
2.1.3	Segurança e toxicidade potencial.....	15
2.2	Galinha-doméstica	17
2.2.1	Uso do embrião de galinha-doméstica como organismo-modelo	17
<u>2.2.1.1</u>	<u>Limitações e vantagens enquanto modelo experimental.....</u>	<u>19</u>
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Origem do material vegetal e preparo dos extratos	21
3.2	Modelo animal e desenho experimental.....	23
3.3	Método de exposição	24
3.4	Coleta dos embriões e preparo das lâminas permanentes	25
3.5	Avaliação morfológica	28
3.6	Análise estatística	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma planta nativa da América do Sul e ocorre em regiões da Argentina, do Paraguai e do Brasil (OLIVEIRA; ROTTA, 1985). É conhecida popularmente por diferentes nomes, como erva-mate, erva, congonha e erva-verdadeira (LORENZI, 1992). Como destaca Gerhardt (2013, p. 18), “a palavra erva-mate pode significar tanto a planta quanto o produto final, ou seja, o pó resultante do beneficiamento das folhas, pecíolos e ramos”. Por conta disso, para tentar evitar polissemias, serão empregados, preferencialmente, os termos “erva-mate” ao se mencionar o vegetal e “erva-mate beneficiada” para se referir ao produto do processamento da planta.

Devido a suas propriedades medicinais e estimulantes, a planta processada é utilizada no preparo de bebidas tradicionais há séculos (BRACESCO *et al.*, 2011). Segundo a medicina tradicional dos povos nativos sul-americanos, a erva-mate possui ação digestiva, cicatrizante, antigripal e estimulante (BARBOZA *et al.*, 2009). Embora fosse muito conhecida e utilizada antes da chegada dos colonizadores europeus, a planta foi descrita cientificamente somente no século XIX (SAINT-HILAIRE, 1822). Seu uso na forma de bebida é muito comum entre os sul-americanos e o hábito possui inestimável valor sociocultural, especialmente onde a erva-mate é nativa (SARREAL, 2015).

Extratos de *I. paraguariensis*, preparados sob diferentes formas, apresentam atividades antimicrobianas, antiparasitária, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética, cardioprotetora e neuroprotetora (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Seu potencial terapêutico está diretamente relacionado à variabilidade fitoquímica da planta (CROGE; CUQUEL; PINTRO, 2021). Os principais compostos bioativos incluem polifenóis, alcaloides e saponinas, assim como aminoácidos, vitaminas e minerais (LIMA, 2010).

Apesar de ser uma planta amplamente consumida, são escassos os estudos a tratar do seu potencial tóxico. Ademais, a partir das evidências disponíveis, ainda há pouco consenso sobre sua segurança. Enquanto alguns trabalhos demonstram a falta de efeitos tóxicos (PEGORARO *et al.*, 2018; SANTOS; MATIJASEVICH; VALLE, 2005), outros relatam possíveis resultados prejudiciais (SAMPAIO *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2014). Pesquisas analisando a ação direta sobre o

desenvolvimento embrionário revelaram ausência de toxicidade (SOUSA *et al.*, 2019; STRASSMANN *et al.*, 2008).

Dessa maneira, objetivou-se avaliar se a exposição a extratos de erva-mate interfere no desenvolvimento embrionário inicial de vertebrados. Especificamente, foram analisados parâmetros acerca da sobrevivência, frequência cardíaca e estagiamento dos embriões, assim como a ocorrência de malformações. Para tanto, ovos férteis de galinha-doméstica foram usados como modelo experimental, tendo em vista vários fatores favoráveis ao seu uso em pesquisa (SCHOENWOLF, 1999; VERGARA; CANTO-SOLER, 2012). Através deste estudo, pretende-se contribuir para a ampliação dos conhecimentos sobre a segurança dos extratos de erva-mate.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O referencial teórico apresentado nesta seção foi estruturado em tópicos e compreende aspectos gerais acerca do tema da pesquisa, a erva-mate, e sobre o organismo utilizado como modelo experimental, o embrião de galinha-doméstica.

2.1 Erva-mate

A espécie *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., da família Aquifoliaceae Bercht. & J.Presl, foi classificada cientificamente no início do século XIX pelo botânico e naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire, quando viajava pela América do Sul (SAINT-HILAIRE, 1822) (FIGURA 1). Dentre outros nomes, a planta é popularmente conhecida como erva-mate, erva, congonha e erva-verdadeira (LORENZI, 1992). Característica de regiões de Floresta Ombrófila Mista e geralmente encontrada em associações evoluídas com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, a erva-mate é uma planta perenifólia, de porte arbóreo e, quando cultivada, sua altura varia de três a cinco metros (CARVALHO, 2003). A área de distribuição natural abrange regiões da Argentina, do Paraguai e, no Brasil, os estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e locais com ocorrência de *A. angustifolia* em São Paulo e Minas Gerais (OLIVEIRA; ROTTA, 1985).

A depender da região, a erva-mate é processada de diferentes modos e empregada na produção de distintas bebidas tradicionais (BERTÉ *et al.*, 2014). De modo geral, folhas, pecíolos e ramos finos da planta são colhidos, selecionados e passam por etapas de beneficiamento – que inclui desidratação, secagem, trituração e moagem do material vegetal (BERTÉ, 2011). Como resultado desse processo, obtém-se a erva-mate beneficiada, consumida na forma de chimarrão, tereré e *mate cocido* (BASTOS *et al.*, 2007). O chimarrão e o tereré são tipos de infusões preparadas com água quente e fria, respectivamente (MEINHART *et al.*, 2010). O *mate cocido* é um tipo de chá preparado por decocção ou infusão e geralmente ingerido quente (BASTOS *et al.*, 2007; ROLÓN *et al.*, 1995). Segundo Berté (2011), a erva-mate beneficiada pode ainda passar por um processo de torrefação e ser usada na produção de chá-mate, uma infusão caracteristicamente de cor escura.

Figura 1 – Ilustração dos ramos, folhas, flores e frutos de *I. paraguariensis*

Fonte: Vogtherr (1898).

Além do uso tradicional, a planta tem sido empregada em vários setores da economia, como nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Dentre as várias aplicações industriais da erva-mate, destaca-se sua utilização como suplemento alimentar (SARAIVA *et al.*, 2019; SANTETTI *et al.*, 2021); na produção de cervejas e refrigerantes (OELLIG; SCHUNCK; SCHWACK, 2018); como corante têxtil (GIACOMINI *et al.*, 2017); e aplicada em embalagens biodegradáveis (JARAMILLO *et al.*, 2016; KNAPP *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, diferentes componentes da erva-mate e resíduos do processo de beneficiamento passaram a ter importantes aplicações agroindustriais, sinalizando um potencial de inovação que precisa ser mais explorado (GULLÓN *et al.*, 2018; CROGE; CUQUEL; PINTRO, 2021).

2.1.1 Breve resgate histórico-cultural

Segundo Dellacassa e Bandoni (2001), o emprego da erva-mate como planta medicinal e bebida estimulante integra as tradições do povo Guarani, etnia indígena da América do Sul. Evidências arqueológicas confirmam seu uso pelos antigos povos andinos e paraguaios, muito antes da chegada dos exploradores europeus (SMALL; CATLING, 2001). No século XVI, a partir do contato com habitantes do Paraguai, os espanhóis começaram a consumir a erva-mate e, em pouco tempo, expandiram a prática para outras regiões sul-americanas, instigando o início da comercialização (FOLCH, 2010). A expansão do costume para o Brasil ocorreu inicialmente através do contato entre bandeirantes² e indígenas paraguaios capturados, ainda no século XVII (PORTER, 1950).

Após o estabelecimento dos jesuítas³ no Paraguai, no início do século XVII, o consumo da erva-mate foi inicialmente combatido, por ser visto como um vício demoníaco – o que fez os indígenas recorrer a bebidas alcoólicas tradicionais (DELLACASSA *et al.*, 2007). Por conta disso, os clérigos católicos acabaram por entender que seu uso não seria assim tão prejudicial e passaram a permiti-lo (BURGOS; MEDINA, 2017). Progressivamente, os jesuítas dominaram áreas de

² Exploradores do interior sul-americano durante o período colonial brasileiro.

³ Membros da Companhia de Jesus, ordem religiosa da Igreja Católica Apostólica Romana.

ervais nativos e se tornaram muito influentes na indústria ervateira (PORTER, 1950). Um de seus maiores triunfos, no entanto, foi conseguir cultivar a erva-mate fora da floresta, nas dependências de seus povoados, algo reconhecidamente muito complicado para a época (LÓPEZ, 1974). Durante o século XVIII, a produção a partir dos ervais jesuíticos aumentou e o consumo da erva-mate se tornou habitual em outras regiões, como no Chile e no Peru (BURGOS; MEDINA, 2017). Em meados do século XVIII, devido a competição comercial com colonos ervateiros e por outras razões geopolíticas, os jesuítas foram expulsos dos territórios espanhóis (FOLCH, 2010). Após o banimento, considerado um retrocesso para a história da erva-mate, as plantações jesuíticas foram abandonadas e grande parte da produção voltou a depender de ervais nativos, sob o comando de um pequeno oligopólio paraguaio (JAMIESON, 2001; GIBERTI, 1994; IOMMI, 2021). Apesar do protagonismo paraguaio, a comercialização da planta pelo território brasileiro, sobretudo nas proximidades da cidade de Curitiba, já ocorria desde o início do século XIX (BRANDT; SILVA, 2014).

No final do século XIX, após a devastação do território paraguaio causada pela Guerra do Paraguai (1864-1870), o Brasil se tornou o maior produtor, mantendo essa posição até a década de 1930, quando a indústria de café cresceu no país e a Argentina assumiu a liderança, em produção e consumo de erva-mate (FOLCH, 2010). Parcialmente por conta da exploração nativa limitada, estudos sobre germinação de sementes na virada para o século XX permitiram o restabelecimento de plantações de *I. paraguariensis*, mais de 100 anos depois da expulsão dos pioneiros jesuítas (GIBERTI, 1994; BURGOS; MEDINA, 2017). O hábito disseminado entre os nativos também foi adquirido pelos imigrantes europeus e asiáticos, estabelecidos na região sul-americana a partir do século XIX (KUJAWSKA, 2018; FOLCH, 2010).

Atualmente, produtos à base de erva-mate são consumidos em vários países além da América do Sul, mas as exportações equivalem a menos de 5 % do total produzido (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Todavia, algo que dificilmente pode ser exportado é o peso cultural que a erva-mate possui na América do Sul, associada a uma boa conversa entre amigos, a construção de novas amizades ou a um momento de reflexão ao final do dia (SARREAL, 2015; BRAGANÇA; MELNIKOV; ZANONI, 2011).

2.1.2 Composição química e propriedades biológicas

Os compostos químicos presentes na planta *in natura*, na erva-mate beneficiada e nas bebidas tradicionais podem variar quantitativamente conforme os métodos de processamento e armazenamento do material vegetal e o modo de preparo das bebidas (DELLACASSA; BANDONI, 2001; BERTÉ *et al.*, 2014). Além disso, vários fatores ambientais, como intensidade luminosa e pH do solo, também podem ser influentes sobre os aspectos fitoquímicos da erva-mate (RIACHI *et al.*, 2018; TOPPEL *et al.*, 2018). Sumariamente, a composição química de *I. paraguariensis* compreende polifenóis, alcaloides, saponinas, aminoácidos, vitaminas e minerais (LIMA, 2010). Segundo Burris *et al.* (2012), as principais classes de compostos bioativos presentes na planta incluem flavonoides (quercetina, kaempferol, rutina), ácidos aromáticos (ácido clorogênico, ácido cafeico), metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina) e matessaponinas. Tal variabilidade fitoquímica está diretamente relacionada aos benefícios terapêuticos associados ao consumo de erva-mate (CROGE; CUQUEL; PINTRO, 2021).

Diferentes partes da planta são tradicionalmente usadas pela sua ação cicatrizante, antigripal, estimulante contra a fraqueza física e mental e como tratamento para distúrbios inflamatórios, digestivos e hepáticos (BARBOZA *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012). Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas ao consumo da erva-mate, suas propriedades antioxidante, analgésica, diurética e antimicrobiana se destacam (HECK; MEJIA, 2007). Ademais, como revisado por Gawron-Gzella, Chanaj-Kaczmarek e Cielecka-Piontek (2021), sob diferentes formas de preparo e administração, a erva-mate apresenta atividades neuroprotetora, antimicrobiana (antifúngica, antiviral e antibacteriana), antiparasitária, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética, cardioprotetora e redutora de peso (devido a sua ação moduladora sobre o metabolismo lipídico).

2.1.3 Segurança e toxicidade potencial

Apesar do seu consumo disseminado por regiões sul-americanas há séculos, estudos avaliando o potencial tóxico de *I. paraguariensis* ainda são escassos (ANDRADE *et al.*, 2012). Trabalhos publicados durante os anos 1980

foram os primeiros a relacionar o consumo de erva-mate à alta incidência de casos de câncer de esôfago em países consumidores, como Uruguai, Argentina e Brasil (LORIA; BARRIOS; ZANETTI, 2009). Apesar da falta de consenso sobre seu potencial carcinogênico, dois possíveis mecanismos são considerados importantes: (i) dano térmico causado pela ingestão de bebidas em temperaturas muito elevadas; ou (ii) dano químico causado pela ação de componentes presentes nas infusões da planta, tal como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SEHNEM; VELTRINI, 2012; ORANUBA *et al.*, 2019). Conforme estudo da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, baseado em uma revisão de pesquisas epidemiológicas, bebidas preparadas com erva-mate são “[...] provavelmente carcinogênicas para humanos [...]” somente quando consumidas muito quentes (> 65°C) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018, p. 488, tradução nossa). Além disso, um efeito sinérgico entre os mecanismos químico e físico é considerado pouco provável (OKARU *et al.*, 2018).

Resultados sobre a genotoxicidade de *I. paraguariensis* também são contrastantes. Leitão e Braga (1994) e Fonseca *et al.* (2000) demonstraram o efeito mutagênico e genotóxico de extratos de erva-mate em células bacterianas e animais *in vitro*. Conforme Wnuk *et al.*, (2009), em estudo com linfócitos humanos, as atividades citotóxicas e genotóxicas de extratos de erva-mate podem ser relacionadas ao seu conteúdo de cafeína. Segundo Heck e Mejia (2007), no entanto, estes resultados não foram reproduzidos em estudos *in vivo*. Sampaio *et al.* (2012) relatam a ação genotóxica da erva-mate em células sanguíneas *in vitro* e em ratos Wistar. Resultado oposto do obtido por outros autores em estudos com humanos e animais (ALBAS *et al.*, 2014; PEGORARO *et al.*, 2018). Além da ausência de efeito genotóxico, algumas pesquisas demonstraram que a erva-mate possui atividade antimutagênica (KAEZER *et al.*, 2012; BRACESCO *et al.*, 2018) e pode proteger contra danos e aumentar a atividade de reparo do DNA *in vivo* (MIRANDA *et al.*, 2008).

Trabalhos analisando os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário humano são insuficientes e apresentam resultados antagônicos. Enquanto Santos, Matijasevich e Valle (2005) defendem que o consumo de erva-mate não interfere sobre o crescimento intrauterino ou na duração da gravidez, Moraes *et al.* (2014) sustentam que, devido a presença de cafeína, a ingestão de erva-mate pode representar um risco, especialmente para o nascimento de bebês com peso menor.

Sousa *et al.* (2019, p. 100, tradução nossa) consideram o extrato aquoso de erva-mate “[...] provavelmente seguro para consumo durante a gestação”, tendo em vista a ausência de efeitos tóxicos observados em ratas Wistar prenhas e seus filhotes, após consumo de um extrato aquoso das folhas de *I. paraguariensis* preparado por sucessivas extrações, como na forma tradicional. Andrade *et al.* (2012) não observaram efeitos tóxicos sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos e em exames histológicos de órgãos de murinos e coelhos submetidos a administração de um extrato aquoso de erva-mate. O único estudo sobre os efeitos diretos em embriões de galinha-doméstica foi realizado por Strassmann *et al.* (2008), os quais concluíram que a exposição não causou danos embriotóxicos e, inclusive, promoveu o crescimento embrionário.

2.2 Galinha-doméstica

Considerando sua importância alimentar mundial e as tecnologias empregadas nos sistemas de produção industrial, a galinha-doméstica figura entre os animais domesticados mais dispersos e numerosos do mundo (PETERS *et al.*, 2016; BENNETT *et al.*, 2018). Sabe-se que a galinha-doméstica moderna descende de uma linhagem de galo-banquiva, *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758), espécie selvagem inicialmente domesticada há cerca de oito mil anos em regiões do sul e sudeste da Ásia (LAWAL *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2006). Ademais, durante o processo de domesticação e dispersão, ocorreram intensos intercruzamentos com outras espécies do gênero *Gallus* e subespécies de *G. gallus* (WANG, M.-S. *et al.*, 2020). Devido a semelhanças morfológicas e comportamentais, embora não seja oficialmente reconhecida, a galinha-doméstica é normalmente considerada uma subespécie de galo-banquiva, denominada *Gallus gallus domesticus* (LAWAL; HANOTTE, 2021).

2.2.1 Uso do embrião de galinha-doméstica como organismo-modelo

Continuamente utilizado em pesquisas por mais de dois mil anos, o embrião de galinha-doméstica é considerado o mais antigo modelo animal em experimentação (STERN, 2004). Os primeiros a sistematicamente investigar o

desenvolvimento embrionário da galinha-doméstica foram os antigos gregos, como Hipócrates e Aristóteles, que abriam ovos em diferentes momentos da incubação para realizar observações e dissecações (BELLAIRS; OSMOND, 2014). Até o século XVII, poucos trabalhos foram tão influentes quanto os de Aristóteles, cabendo destaque às investigações de Alberto Magno sobre a organogênese embrionária, no século XIII, e os de Volcher Coiter sobre anatomia comparada, no século XVI (WOLPERT, 2004; KAIN *et al.*, 2014). Dentre outros importantes estudos desenvolvidos durante o século XVII, distinguem-se as descrições sobre o sistema circulatório realizadas por William Harvey e a descoberta e caracterização dos capilares sanguíneos, do sulco neural e dos somitos por Marcello Malpighi (STERN, 2005).

Durante os séculos XVIII e XIX, o aperfeiçoamento de métodos de coloração e seccionamento histológico, em conjunto com o aprimoramento da microscopia, possibilitou descrições mais detalhadas e abrangentes sobre o desenvolvimento embrionário (WOLPERT, 2004; STERN, 2005). Esses avanços técnicos e tecnológicos permitiram, por exemplo, a construção de conhecimentos iniciais sobre a importância dos folhetos embrionários por Christian Pander e Karl von Baer (STERN, 2004). No final do século XIX, especialmente por influência dos trabalhos de Wilhelm Roux, uma abordagem mais experimental foi estabelecida e os estudos, tradicionalmente descritivos e observacionais, passaram a ter um aspecto mais experimental e preditivo (BELLAIRS; OSMOND, 2014). A partir dessa perspectiva, foram conduzidos os primeiros bioensaios *in ovo* com o objetivo de verificar os efeitos de diferentes compostos sobre o desenvolvimento embrionário normal (FÉRE, 1893, 1899). Durante o século XX, trabalhos com objetivos similares se tornaram comuns (HAMMETT; WALLACE, 1928; FRANKE *et al.*, 1936; DURAISWAMI, 1950; MCLAUGHLIN JUNIOR *et al.*, 1963).

Juntamente com os vários avanços técnicos das últimas décadas, o embrião de galinha-doméstica continua sendo um organismo modelo clássico, usado em inúmeras áreas de estudo para diferentes propósitos (DAVEY; TICKLE, 2007; BELLAIRS; OSMOND, 2014; STERN, 2018). Por exemplo, para avaliar os efeitos da exposição *in ovo* a diferentes substâncias sobre o desenvolvimento embrionário, tais como metais pesados (YAMAMOTO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2021), agrotóxicos (WANG *et al.*, 2016; ARCAIN *et al.*, 2021), compostos de origem vegetal (GUSTAFSSON; JACOBSSON, 2019; BEKHET; SAYED, 2021), contaminantes

ambientais (KMECICK *et al.*, 2019; ZINABADINOVA *et al.*, 2018) e fármacos (METE *et al.*, 2016; KHOSRAVI *et al.*, 2018).

2.2.1.1 Limitações e vantagens enquanto modelo experimental

O uso embrião de galinha-doméstica como organismo-modelo em estudos de embriotoxicidade e teratogenicidade já foi desencorajado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967), apesar da falta de evidências para suportar essa “recomendação” (HEMMINKI, 1983). Dentre as principais críticas estão a alta sensibilidade dos embriões, o que poderia levar a resultados pouco confiáveis; a ausência de relações diretas com o organismo materno (também considerada uma vantagem); e a baixa similaridade farmacocinética em comparação com mamíferos (HILL; HOFFMAN, 1984). Contudo, conforme destaca Jelinek (1982), evidências experimentais revelam que algumas dessas objeções advêm de técnicas de exposição inadequadas, baixa padronização experimental e negligência de princípios teratológicos. A depender do desenho experimental do estudo, algumas limitações podem ser difíceis de contornar, como o possível efeito prolongado de uma única exposição, considerando que não há excreção para fora do ovo até a eclosão, e a reprodução da influência exercida pela barreira placentária sobre as rotas de exposição, por exemplo (BJØRNSTAD *et al.*, 2015).

Para Schoenwolf (1999), os embriões de aves são excelentes modelos experimentais para estudar o desenvolvimento embrionário de vertebrados. De acordo com Smith, Flentke e Garic (2012), considerando rotas de sinalização altamente conservadas entre ambos os grupos, o desenvolvimento embrionário das aves é mais similar ao dos mamíferos do que de peixes ou outros tetrápodes. Por exemplo, levando em conta o tempo total de crescimento, eventos observados durante o desenvolvimento de embriões de galinha-doméstica com três dias são equivalentes aos que ocorrem em embriões humanos de 34 a 38 dias ou aproximadamente cinco semanas (VAINIO; IMHOF, 1995; BJØRNSTAD *et al.*, 2015). Dentre outras, algumas das principais vantagens do modelo incluem o baixo custo e facilidade na aquisição dos ovos; técnicas acessíveis em relação ao manuseio e métodos de exposição; independência do ambiente externo; semelhanças moleculares, celulares e anatômicas com embriões humanos; e o

tempo total de desenvolvimento relativamente curto (21 dias) e bem documentado (SCHOENWOLF, 1999; HENSHEL; DEWITT; TROUTMAN, 2002; VERGARA; CANTO-SOLER, 2012). Ademais, as influências exercidas pelo organismo materno se restringem à composição do ovo e a aspectos genéticos do embrião (BEDNARCZYK *et al.*, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UTFPR (CEUA-UTFPR), sob o protocolo número 2019-23. As práticas experimentais e analíticas foram executadas no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV).

3.1 Origem do material vegetal e preparo dos extratos

Para avaliar possíveis influências da origem e do modo de processamento da planta, foram usados dois tipos de erva-mate beneficiada: (i) erva-mate comercial, colhida e processada por uma empresa especializada; e (ii) erva-mate bruta, de preparação própria com material colhido na UTFPR-DV. Como indicado na embalagem, a erva-mate comercial não continha adoçantes e estava dentro do prazo de validade.

O procedimento de preparo da erva-mate bruta seguiu metodologia adaptada de Warmling (2018). Aproximadamente quatro quilogramas de folhas e ramos de *I. paraguariensis* foram coletados de espécimes cultivados na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UNEPE) Suinocultura da UTFPR-DV (FIGURA 2). No laboratório, o material vegetal foi lavado em água corrente, para remover possíveis contaminantes, e seco com papel-toalha. Em seguida, dentro de envelopes de papel Kraft, o material foi acondicionado em estufa de secagem a aproximadamente 65°C, onde permaneceu por 48 h. Em seguida, os ramos secos foram triturados em moinho de facas tipo Willey TE-648 (Tecnal) e se obteve, assim, um pó de granulometria 0,5 mm. A erva-mate bruta foi mantida em saco plástico armazenado em geladeira, ao abrigo da luz e sob refrigeração (cerca de 0°C). Imagens das etapas dos procedimentos descritos são mostradas na Figura 3.

Ambos os extratos foram preparados em uma sala escura, simultaneamente. A 1 L de água destilada a 70°C foi adicionado 30 g de erva-mate beneficiada (bruta ou comercial) e a mistura permaneceu sob agitação constante por 15 min. Em seguida, ambas as soluções foram deixadas em repouso para se resfriar e, na sequência, passaram por dois processos de filtração. Primeiramente, através de

uma cama de duas camadas de gazes, com cerca de 30 gazes hospitalares abertas, para a separação de partículas maiores. Na sequência, com o auxílio de uma bomba de vácuo SL 60 (Solab), as soluções foram filtradas em papel-filtro Quanty JP41 (J Prolab), com poros de 28 μm . Os extratos foram então esterilizados usando autoclave vertical (Phoenix Lufanco) e armazenados em geladeira, ao abrigo da luz e sob refrigeração (cerca de 0°C), até o momento de realização dos experimentos.

Figura 2 – Imagens da área de coleta dos ramos de erva-mate na UNEPE Suinocultura



Fonte: Autoria própria.

Figura 3 – Imagens das etapas do procedimento realizado para a produção da erva-mate bruta



Nota – 1: ramos verdes pós-lavagem; 2: ramos embalados em papel Kraft no interior da estufa de secagem; 3: ramos secos; 4 e 5: procedimento de trituração dos ramos secos da planta.

Fonte: Autoria própria. A imagem 4 foi fotografada por Jean da Silva Amancio (arquivo pessoal).

3.2 Modelo animal e desenho experimental

Ovos fertilizados de galinha-doméstica das linhagens Cobb ou Ross, de 36 a 40 semanas, foram adquiridos de incubatório comercial do município de

Dois Vizinhos, PR. Os ovos pesavam entre 60 g e 65 g e não apresentavam rachaduras. No laboratório, antes do procedimento de injeção, os ovos foram higienizados com papel-toalha umedecido em etanol a 70 %. Como mostrado no Quadro 1, os experimentos foram executados com três grupos experimentais. Cada grupo experimental contou com 30 ovos, perfazendo um total de 90 ovos incubados.

Quadro 1 – Grupos experimentais utilizados neste estudo

Grupos experimentais	Substância injetada nos ovos
Controle fechado (CF)	Sem injeção (controle negativo)
Extrato de erva-mate comercial (EC)	Aprox. 100 µL de extrato aquoso de erva-mate comercial
Extrato de erva-mate bruta (EP)	Aprox. 100 µL de extrato aquoso de erva-mate bruta

Fonte: Autoria própria.

3.3 Método de exposição

O procedimento de injeção foi realizado em capela de fluxo laminar vertical (BSTec), previamente à incubação dos ovos. Foram injetados aproximadamente 100 µL de cada extrato aquoso, conforme cada grupo experimental, uma única vez, na câmara de ar dos ovos, local que permite melhor dispersão das substâncias sobre o embrião (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Primeiramente, foi realizado um furo na casca do ovo com uma agulha hipodérmica descartável e, logo em seguida, os extratos foram injetados, a temperatura ambiente, com uma seringa descartável de 1 mL, com agulha. Para tornar o procedimento mais preciso, antes da injeção, os ovos foram iluminados com uma lanterna de bolso e os limites ou o centro da câmara de ar foram marcados com um lápis grafite (HENSHEL; DEWITT; TROUTMAN, 2002; ANDERSSON; GRIPENLAND; JOHANSSON, 2015). As etapas do procedimento de injeção são apresentadas na Figura 4.

Após a injeção, os ovos foram selados com um pequeno pedaço de fita adesiva, identificados conforme o grupo experimental ao qual pertenciam e aleatoriamente posicionados em um suporte próprio para incubação, com a câmara de ar voltada para cima. Em seguida, o suporte contendo os ovos foi alocado em incubadora Juli 70 (Chocmaster) e procedeu-se à incubação por três dias (aprox. 72 h), sob temperatura controlada (37,5°C), umidade relativa entre 50 % e 60 % e ventilação forçada constante.

Figura 4 – Etapas do procedimento de injeção dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* na câmara de ar dos ovos



Nota – 1: marcação do centro da câmara de ar do ovo; 2: perfuração da casca do ovo, sobre a câmara de ar; 3: injeção das soluções na câmara de ar dos ovos; 4: oclusão do orifício na casca dos ovos com fita adesiva; 5: identificação do grupo experimental ao qual os ovos pertenciam; 6: ovos aleatoriamente organizados no suporte para incubação; 7: ovos alocados no interior da incubadora.

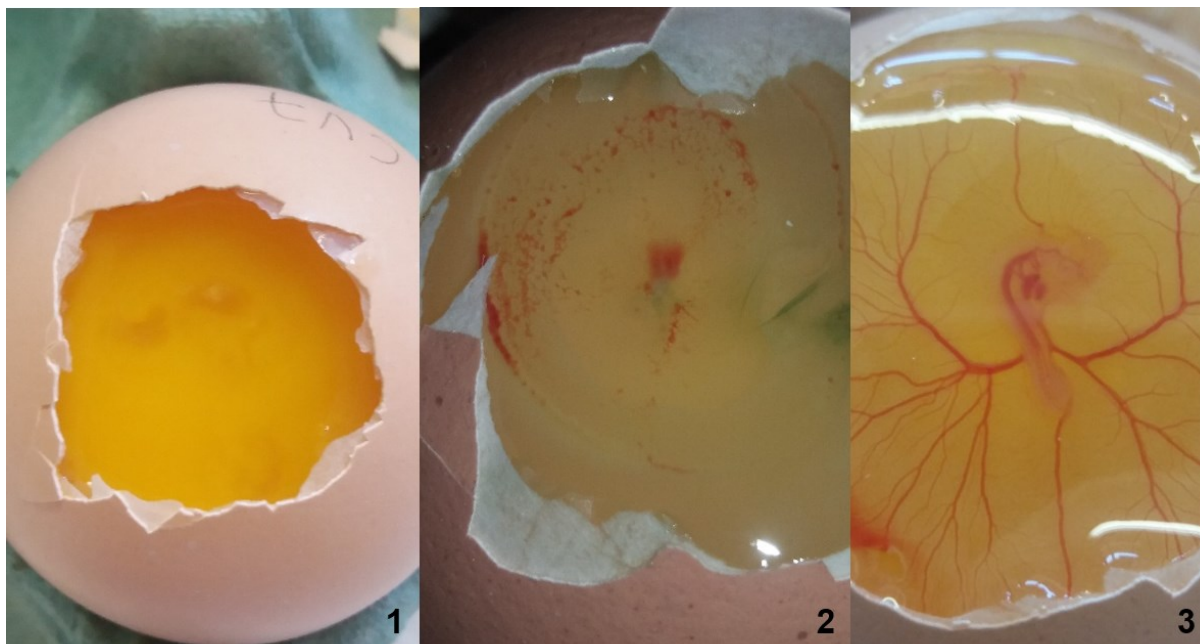
Fonte: Autoria própria. As imagens de 1 a 5 foram fotografadas por Jean da Silva Amancio (arquivo pessoal).

3.4 Coleta dos embriões e preparo das lâminas permanentes

Decorrido o tempo de incubação, um por vez, os ovos foram retirados da incubadora e abertos com o auxílio de tesoura e pinças. Ovos sem a presença de estruturas embrionárias referentes ao desenvolvimento normal, em relação ao tempo de incubação transcorrido, foram classificados como inviáveis. Ovos com embriões

sem batimentos cardíacos foram considerados mortos e ovos contendo embriões com batimento cardíaco observável foram considerados vivos (FIGURA 5). Ovos inviáveis e embriões mortos foram contabilizados para as análises de viabilidade e sobrevivência e descartados na UNEPE Compostagem da UTFPR-DV.

Figura 5 – Classificação realizada com relação a inviabilidade dos ovos e a sobrevivência dos embriões



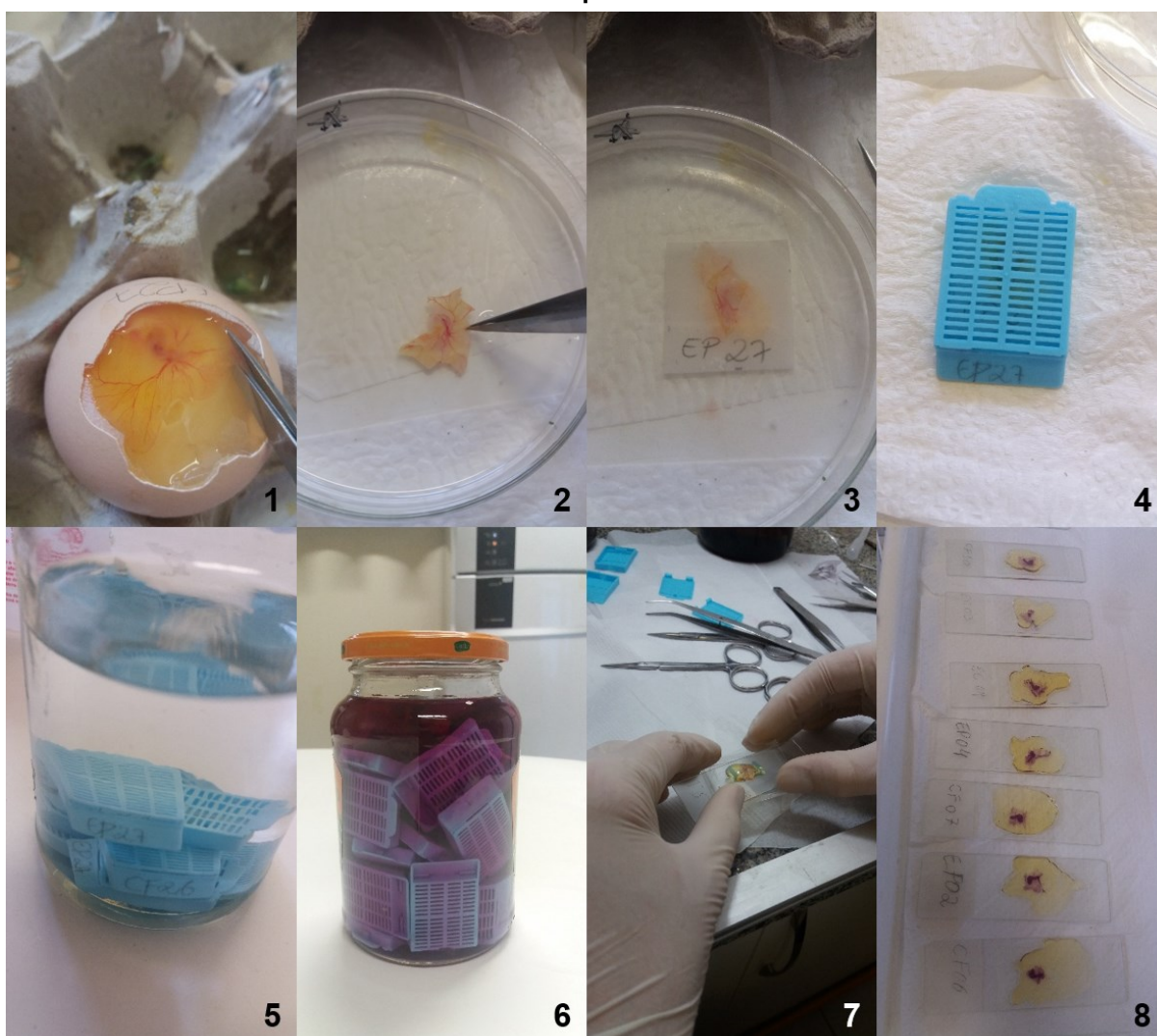
Nota – 1: ovo inviável; 2: ovo com embrião morto; 3: ovo com embrião vivo.
Fonte: Autoria própria.

Após a abertura do ovo, antes da eutanásia, a frequência cardíaca dos embriões vivos foi aferida seguindo a metodologia de Kmecick (2017). Os batimentos cardíacos foram contabilizados por um período cronometrado de 15 s e o valor encontrado foi multiplicado por quatro ($\times 4$), para se obter o número de batimentos por minuto (bpm).

Embriões vivos foram submetidos a eutanásia através de resfriamento e, após a constatação da morte, foram coletados em placa de Petri contendo água destilada. O excesso de vitelo foi removido e um papel-filtro quadrado (2 cm), com um recorte em losango na região central, foi encaixado sobre o embrião para manter suas membranas distendidas. Após a coleta, os embriões foram preparados pela técnica da montagem total (ORTOLANI-MACHADO *et al.*, 2012). Alocados em cassetes histológicos de plástico, os embriões foram fixados por 24 h com a solução de Carnoy (cf. ELY; ROSS, 1949). Em seguida, permaneceram em etanol a 70 % por 24 h e, após hidratação em água destilada, foram corados por 24 h com a

solução corante carmalúmen de Mayer diluída (cf. HUMASON, 1962). Após a coloração, os embriões foram desidratados em uma série crescente de soluções alcoólicas concentradas e diafanizados em xilol (Synth). Para a confecção das lâminas permanentes, os embriões foram montados com bálsamo do Canadá sintético (Dinâmica Química Contemporânea). Os procedimentos de coleta e preparo das lâminas permanentes são mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Etapas do procedimento de coleta e montagem dos embriões de galinha-doméstica em lâminas permanentes



Nota – 1: disco embrionário sendo recortado no momento da coleta; 2: embrião coletado em placa de Petri contendo água destilada; 3: embrião sob um pedaço de papel-filtro; 4: embrião alocado no interior de cassete histológico; 5: embriões nos cassetes em solução fixadora; 6: embriões em frasco de vidro contendo solução corante; 7: montagem dos embriões nas lâminas permanentes; 8: lâminas secando com os embriões já montados.

Fonte: Autoria própria. A imagem 7 foi fotografada por Mycheli Preuss da Cruz (arquivo pessoal).

3.5 Avaliação morfológica

Os embriões montados nas lâminas permanentes foram analisados conforme os estágios de desenvolvimento normal descritos e enumerados (estágios HH) para a espécie por Hamburger e Hamilton (1951). A análise morfológica ocorreu em estereomicroscópio trinocular ZEISS Stemi 305, com câmera acoplada ZEISS AxioCam ERc5s e o registro fotográfico foi realizado com o auxílio do programa ZEISS ZEN 3.4 Lite (blue edition). As pranchas de imagens foram montadas com o programa Microsoft Office PowerPoint 2013.

Através de características morfológicas gerais, como forma e tamanho do corpo, das vesículas encefálicas e ópticas, presença de alantoide e tamanho dos membros, os embriões foram identificados conforme o estágio embrionário mais similar e comparados ao padrão normal descrito. Foram considerados malformados os embriões que apresentavam um padrão de organização corporal alterado.

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados seguiu a metodologia proposta por Vismara (2019). Os dados com distribuição binomial (viabilidade dos ovos, sobrevivência dos embriões, ocorrência de malformações) e com distribuição de Poisson (frequência cardíaca) foram modelados usando o modelo linear generalizado. Foi aplicado o teste de Wald para comparar os tratamentos e o teste de Tukey para a comparação de médias. Os dados referentes aos estágios de desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual atribui postos a cada valor observado e, ao final, compara a média dos postos de cada grupo. Para todos os testes foi considerada a significância de 5 % de probabilidade de erro.

As análises foram realizadas com a ferramenta computacional R, versão 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021), através do programa de desenvolvimento integrado RStudio, versão 1.4.1717 (RSTUDIO TEAM, 2021). Foram usados os pacotes estatísticos *agricolae*, versão 1.3-5 (DE MENDIBURU, 2021) e *lmtest*, versão 0.9-38 (ZEILEIS; HOTHORN, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o número de embriões utilizados em cada análise, conforme a quantidade de ovos incubados, ovos inviáveis e embriões mortos por grupo experimental. A partir da análise estatística dos dados foi possível constatar que os extratos aquosos de erva-mate, bruta ou comercial, não interferiram significativamente sobre os parâmetros viabilidade dos ovos, sobrevivência embrionária e ocorrência de malformações. Contudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos com relação à frequência cardíaca média e aos estágios de desenvolvimento dos embriões.

Tabela 1 – Número de embriões utilizados para cada análise de acordo com a quantidade de ovos incubados (OI), ovos inviáveis (IN) e embriões mortos (EM) por grupo experimental

Grupo experimental	OI	IN	EM	Parâmetros avaliados			
				S ¹	FC	M	EE
Controle fechado (CF)	30	2	3	28	25	25	25
Extrato de erva-mate comercial (EC)	30	2	10	28	18	18	15 ²
Extrato de erva-mate bruta (EP)	30	3	3	27	24	24	24

Nota – S: sobrevivência embrionária; FC: frequência cardíaca; M: ocorrência de malformações; EE: estagiamento embrionário.

¹ Ovos inviáveis foram desconsiderados para a análise de sobrevivência; ² Devido a severas malformações, não foi possível determinar o estágio de desenvolvimento de três embriões, os quais foram desconsiderados para esta análise.

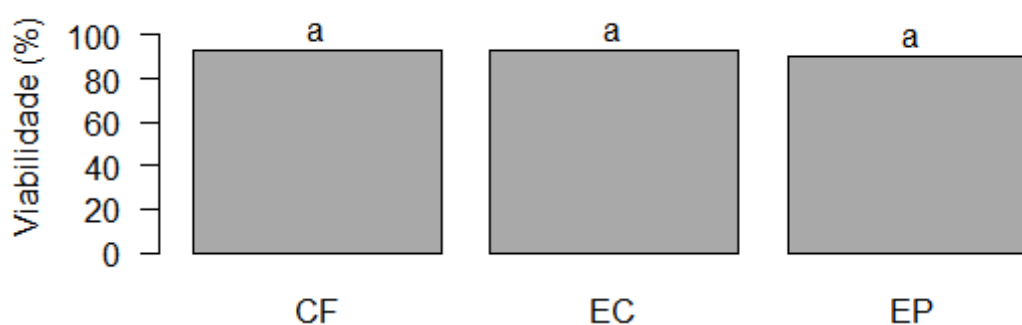
Fonte: Autoria própria.

A taxa de viabilidade dos ovos não diferiu significativamente entre os grupos controle e tratados, variando de 90 % a 93,3 % (FIGURA 7). Este critério se refere à taxa de ovos incubados, assumindo-os como férteis, com embriões que retomaram o desenvolvimento normal, estejam eles vivos ou mortos no momento da abertura do ovo (CRUZ *et al.*, 2021). Dessa maneira, pode-se verificar possíveis efeitos das substâncias em estudo sobre a retomada do desenvolvimento embrionário, o qual cessa quase completamente em temperaturas abaixo de 25°C, após a postura (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

Em estudo conduzido com ovos expostos a filtrados de crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst., Cruz *et al.* (2021) observaram taxas de viabilidade entre 75 % e 100 %, não tendo sido constatadas diferenças significativas. Resultado similar ao de Vismara (2019), que verificou taxas de viabilidade de 73,3 %

a 100 %, ao expor ovos de galinha-doméstica a óleos essenciais de diferentes plantas. Heinrich-Hirsch e Neubert (1991) observaram uma taxa média de viabilidade de 88,9 % em ovos não tratados do grupo controle e, apesar do efeito do tratamento não ter sido analisado estatisticamente, foram verificadas menores taxas de viabilidade em ovos expostos a diferentes doses de aciclovir. Yamamoto (2009) e Debiasi (2011) constataram, respectivamente, que 14 % e 26,5 % dos embriões de três dias dos grupos controle não se desenvolveram, possivelmente indicando a viabilidade dos ovos, respectivamente, de 86 % e 73,5 %.

Figura 7 – Taxa de viabilidade de ovos de galinha-doméstica injetados com extratos de *I. paraguariensis* através da câmara de ar e incubados por três dias



Nota – Taxas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

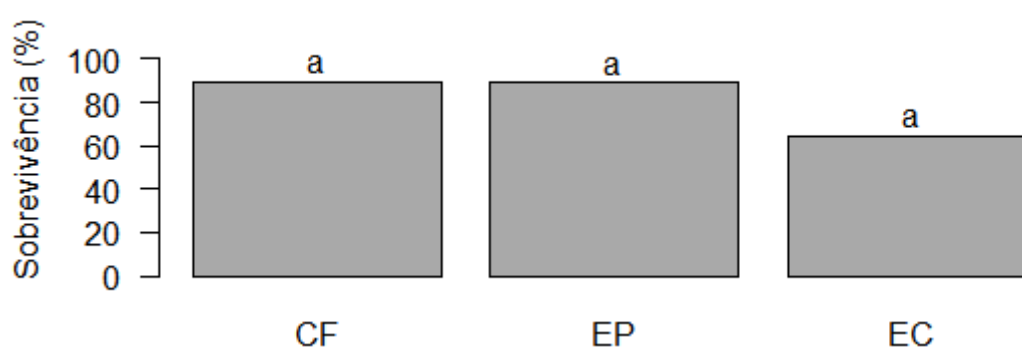
Fonte: Autoria própria.

Não foram encontrados outros trabalhos avaliando os efeitos de extratos de erva-mate sobre a viabilidade de ovos de galinha-doméstica. De fato, esta não é uma informação comumente apresentada em estudos de embriotoxicidade. Apesar de haver objetivos e pressupostos diferentes, este parâmetro pode ser considerado análogo à taxa de fertilidade, usada na indústria avícola e calculada como a relação entre o real número de ovos férteis dentre o total de ovos incubados (ROSA; AVILA, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Considerando apenas os ovos viáveis, foram observadas taxas de sobrevivência de 64,3 % e 88,9 % entre os grupos expostos e de 89,3 % para o grupo controle. Apesar de numericamente diferentes, as taxas de sobrevivência embrionária também não foram significativamente afetadas pela exposição aos extratos de *I. paraguariensis* (FIGURA 8). Valores similares foram verificados nos trabalhos de Yamamoto (2009) e Vismara (2019), em que, respectivamente, 70 % e 80 % dos embriões de três dias do grupo controle sobreviveram. Sousa *et al.* (2019),

avaliando a toxicidade reprodutiva de extratos aquosos de erva-mate sobre ratas Wistar adultas, não verificaram taxas de mortalidade embrionária significativamente diferentes entre os grupos expostos e o grupo controle. Além de apresentar atividades vasculogênica e angiogênica e promover o crescimento embrionário, extratos aquosos de erva-mate não exibiram efeitos tóxicos aparentes sobre embriões de galinha-doméstica de quatro dias (STRASSMANN *et al.*, 2008).

Figura 8 – Taxa de sobrevivência de embriões de galinha-doméstica expostos a extratos de *I. paraguariensis* e incubados por três dias



**Nota – Taxas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.
Fonte: Autoria própria.**

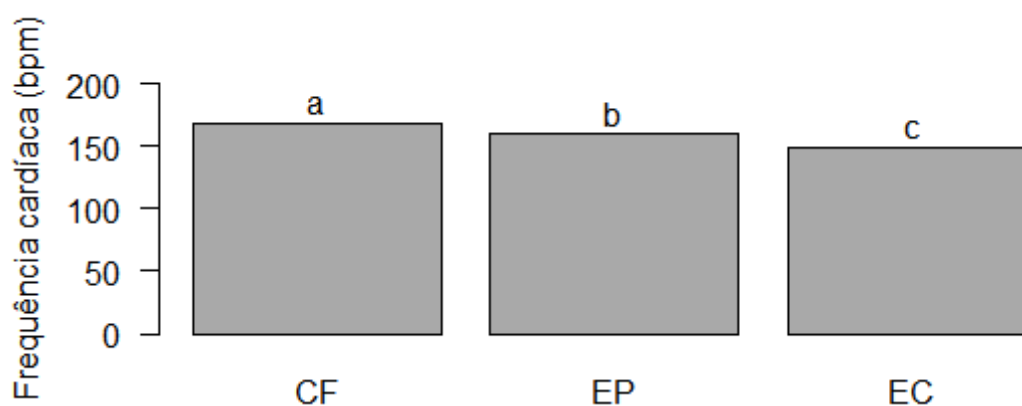
Em se tratando da frequência cardíaca dos embriões, foi observada uma significativa diminuição da média de batimentos cardíacos entre o grupo controle e os grupos tratados com extratos de erva-mate bruta e comercial (FIGURA 9). A frequência cardíaca média para embriões dos grupos expostos foi de 160,3 (EP) e 148,9 (EC) batimentos por minuto (bpm). O grupo controle apresentou, em média, 167,5 bpm. Considerando a falta de dados na literatura, estes podem ser considerados os primeiros resultados sobre a frequência cardíaca de embriões de galinha-doméstica com três dias expostos a extratos de *I. paraguariensis*. No estudo de Kmecick (2017), embriões de galinha-doméstica de três dias de um grupo controle apresentaram, em média, 153 bpm. Valor similar ao observado por Akiyama *et al.* (1999), apesar das diferenças metodológicas.

O aparente efeito bradicárdico observado nos embriões expostos aos extratos de erva-mate pode ser relacionado à composição química da planta. A cafeína representa cerca de 1 % a 2 % do peso seco da erva-mate (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997) e é um de seus compostos mais estudados. Ao expor embriões de galinha-doméstica de quatro dias a diferentes doses de cafeína *in vitro*, Albert

(2006) verificou diminuição da frequência cardíaca embrionária. Rana *et al.* (2010) também observaram significativa redução dose-dependente da frequência cardíaca de embriões de peixe-zebra expostos a cafeína. Por outro lado, há outros estudos que reportam o efeito oposto (BRUYERE JUNIOR *et al.*, 1987), assim como nenhum efeito significativo (HAWKINS; HU; CLARK, 1984). Apesar da falta de trabalhos a respeito dos efeitos de outros compostos químicos presentes na erva-mate sobre a hemodinâmica embrionária, algumas pesquisas experimentais, com diferentes abordagens e objetivos primários, puderam constatar o efeito bradicárdico de alguns compostos presentes em *I. paraguariensis*, como kaempferol e quercetina (ROMERO *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2001; SUCHAL *et al.*, 2017) e os ácidos clorogênico e cafeico (WANG, D. *et al.*, 2020; AGUNLOYE *et al.*, 2019).

É importante ressaltar, no entanto, que os diversos componentes da planta podem agir de forma sinérgica, como reportado por trabalhos anteriores (PUANGPRAPHANT; MEJIA, 2009; LIMA *et al.*, 2017), e exibir resultados diferentes daqueles observados com compostos isolados. Ademais, diferenças na composição dos extratos aquosos em função de distintos métodos de cultivo, processamento da planta e preparo das infusões também podem exercer influências (HECK; SCHMALKO; MEJIA, 2008; ISOLABELLA *et al.*, 2010). Destaca-se ainda, as diferenças hemodinâmicas observadas entre embriões de aves e de mamíferos (NAKAZAWA *et al.*, 1988).

Figura 9 – Frequência cardíaca média de embriões de galinha-doméstica expostos a extratos de *I. paraguariensis* e incubados por três dias

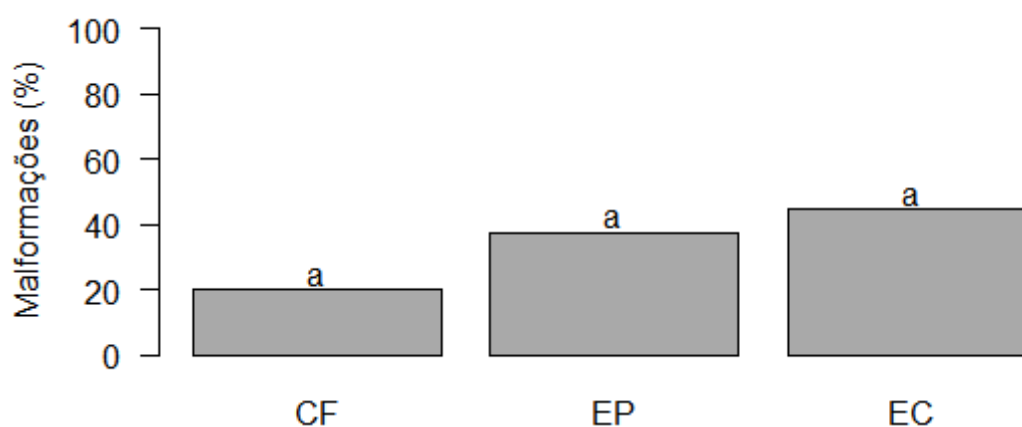


Nota – Médias seguidas por letras distintas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria.

Assim como as taxas de viabilidade dos ovos e sobrevivência embrionária, a ocorrência de malformações não variou significativamente entre os grupos (FIGURA 10). Foram verificadas malformações em 20 % dos embriões vivos do grupo controle (5), 44,4 % do grupo EC (8) e 37,5 % do grupo EP (9). Por conta da falta de significância estatística, os extratos de erva-mate não podem ser considerados teratogênicos ao desenvolvimento embrionário inicial de galinha-doméstica. Dentre as malformações mais representativas, descritas na Tabela 2, verificou-se falhas no fechamento lateral do corpo/gastrosquise; atraso no desenvolvimento; agenesia, atrofia e encurtamento caudais; e falhas no fechamento do tubo neural/raquisquise (FIGURAS 11, 12 e 13). Estudos avaliando o potencial teratogênico de extratos de erva-mate ainda são insuficientes.

Figura 10 – Taxa de ocorrência de malformações em embriões de galinha-doméstica de três dias expostos a extratos de *I. paraguariensis*



Nota – Taxas seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria.

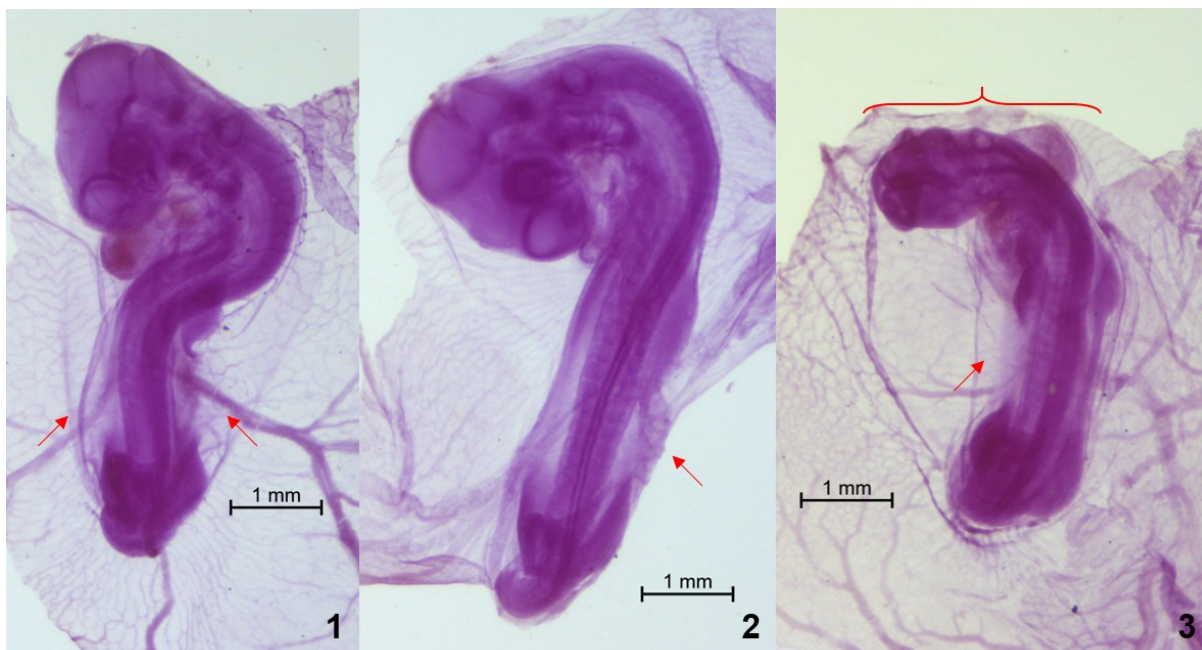
Tabela 2 – Principais malformações observadas em embriões de galinha-doméstica expostos a extratos de *I. paraguariensis* e incubados por três dias por grupo experimental

Tipos de malformações	Grupos experimentais		
	CF	EC	EP
Falhas no fechamento lateral do corpo/Gastrosquise	X	X	X
Atraso no desenvolvimento	X	X	
Encurtamento/Agnesia/Atrofia caudal		X	X
Falhas no fechamento do tubo neural/Raquisquise		X	X
Severas malformações		X	

Fonte: Autoria própria.

Considerando apenas embriões de galinha-doméstica de três dias de grupos controle, alguns estudos experimentais observaram taxas de malformações de 4 % (PINTO, 2020), 6 % (YAMAMOTO, 2009), 12 % (KMECICK, 2017) e de 20 % a 33 % (BORGES, 2018). Steil (2013) constatou que 27,3 % dos embriões de três dias do grupo controle (tampão fosfato-salino) estavam malformados. Segundo Carlson (2019), erros durante o desenvolvimento podem ocorrer mesmo em ambientes normais, especialmente os de origem genética. Conforme Gilbert e Barresi (2019, p. 736), “mesmo um embrião com genes selvagens e um ambiente favorável pode desenvolver um fenótipo anormal como resultado de ‘má sorte’”. Dessa forma, os autores ressaltam a importância de eventos aleatórios, ou estocásticos, durante o desenvolvimento embrionário normal, para além da interação apenas entre fatores genéticos e ambientais. Assim, até certo ponto, falhas durante o desenvolvimento embrionário são consideradas inerentes ao processo.

Figura 11 – Malformações mais representativas observadas em embriões de galinha-doméstica de três dias do grupo não tratado



Nota – 1 e 2: embriões, respectivamente, nos estágios HH19 e HH18 com gastrosquisis (setas); 3: embrião no estágio HH18 com gastrosquisis (seta) e atraso no desenvolvimento da região anterior do corpo (chave).

Fonte: Autoria própria.

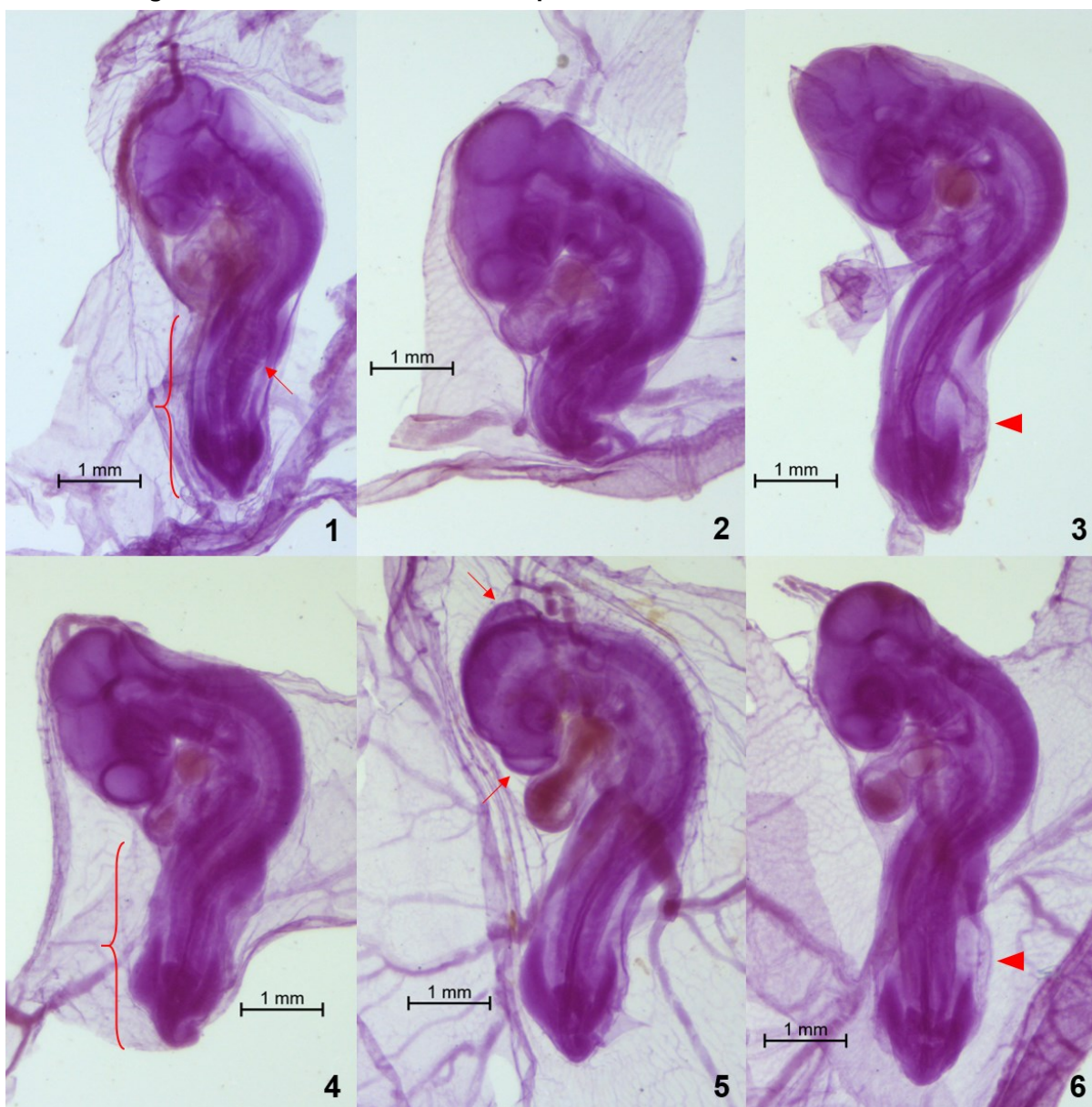
Através da análise morfológica, foi possível identificar embriões em seis diferentes estágios de desenvolvimento, de HH16 a HH21 – com predomínio dos estágios HH18 e HH19. Não se pôde definir o estágio de desenvolvimento de três

embriões do grupo tratado com erva-mate comercial devido a severas malformações, apresentadas nas Figuras 13.2 e 13.3. Conforme Hamburger e Hamilton (1951), embriões com 72 h de incubação devem estar entre os estágios HH19 e HH20. Contudo, geralmente se observa um gradiente de diferentes estágios de desenvolvimento. Isso acontece, especialmente, porque a fertilização em aves é interna e o embrião começa a se desenvolver antes da postura do ovo (BELLAIRS; OSMOND, 2014). Dessa forma, mesmo antes do início da incubação, alguns embriões já podem estar com idades e em estágios de desenvolvimento diferentes. Segundo Doty (2011), fatores genéticos entre raças e variações na temperatura durante a incubação também podem ser influentes. Na Figura 14 são mostrados embriões dentro do padrão morfológico esperado nos diferentes estágios de desenvolvimento observados neste estudo.

Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os estágios de desenvolvimento dos embriões do grupo tratado com o extrato de erva-mate bruta quando comparados aos resultados do grupo controle. Com relação aos estágios de desenvolvimento, os embriões tratados com o extrato de erva-mate comercial não diferiram dos demais (TABELA 3). Isso significa que, em média, embriões expostos ao extrato de erva-mate bruta estavam, no momento da coleta, em estágios de desenvolvimento mais jovens do que os embriões dos outros grupos experimentais. Estes resultados contrastam com o observado nos estudos de Strassmann *et al.* (2008) e Sousa *et al.* (2019), em que efeitos embriotóxicos não foram estatisticamente significativos.

Dentre os poucos estudos a analisar variações nos estágios de desenvolvimento de embriões de galinha-doméstica, Vismara (2019) e Pinto (2020) não observaram diferenças significativas após exposição de embriões de três dias a óleos essenciais e um herbicida comercial, respectivamente. Resultados semelhantes aos encontrados por Arcain (2017, 2020), que também não constatou diferenças entre os grupos controle e tratados com um fungicida sintético comercial. Com relação aos estágios de desenvolvimento, Cruz *et al.* (2021) verificaram que embriões expostos a filtrados de *G. lucidum* diferiram dos demais grupos, controle ou tratados, supondo-se um efeito em função de alterações na frequência cardíaca embrionária, causadas pelos filtrados.

Figura 12 – Algumas das malformações mais representativas observadas em embriões de galinha-doméstica de três dias expostos ao extrato de erva-mate bruta



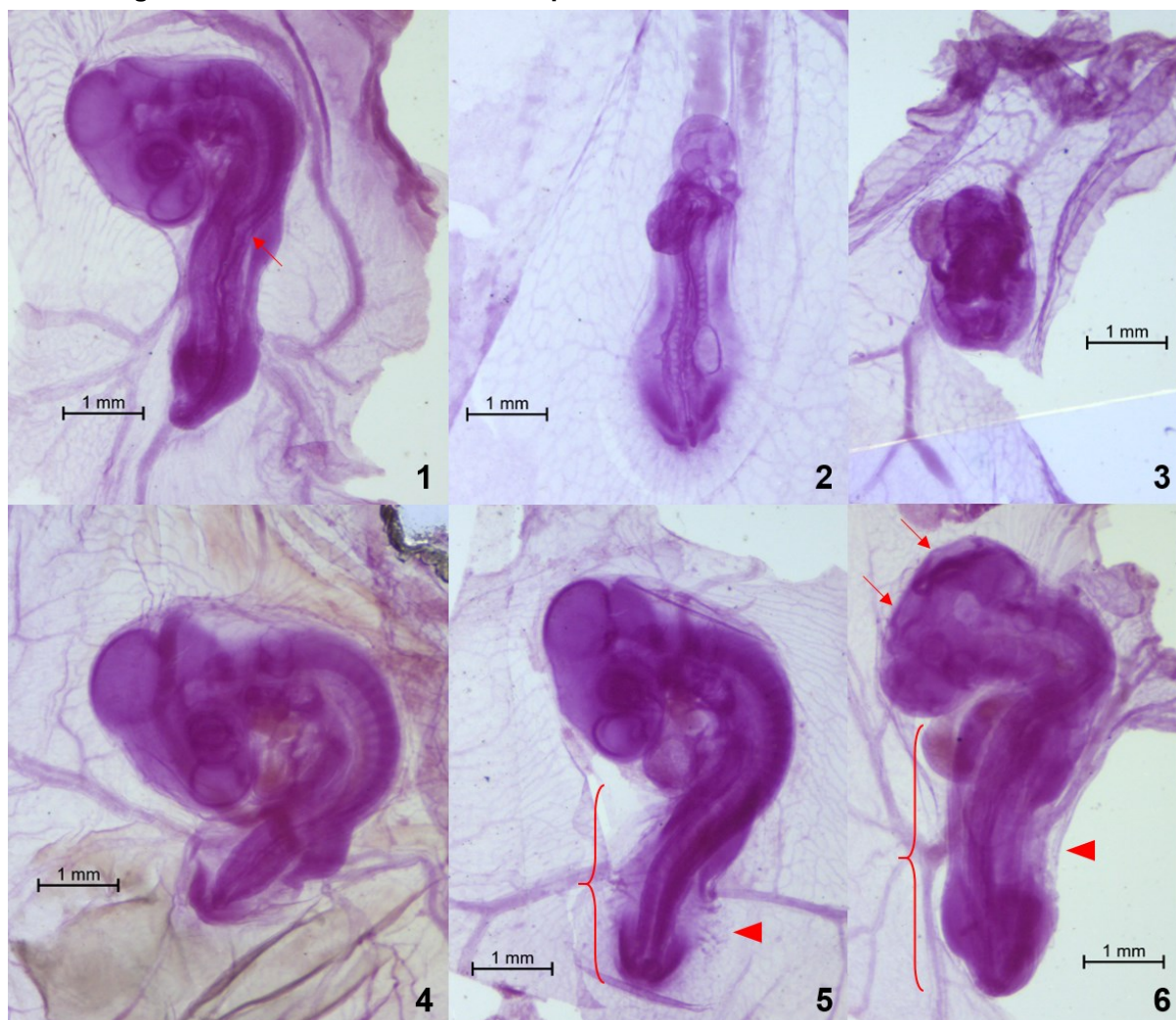
Nota – 1: embrião HH17 com raquisquise (seta) e encurtamento caudal moderado (chave); 2: embrião HH19 com agenesia caudal; 3: embrião HH18 com gastrosquise (cabeça de seta); 4: embrião HH19 com encurtamento caudal (chave); 5: embrião HH18 com falha no fechamento do tubo neural na região cranial (setas); 6: embrião HH17 com falha no fechamento lateral do corpo na região caudal (cabeça de seta).

Fonte: Autoria própria.

A exposição a cafeína pode promover alterações no crescimento embrionário (FENSTER *et al.*, 1991; MOMOI *et al.*, 2008). No entanto, embriões do grupo tratado com o extrato de erva-mate comercial não apresentaram diferenças significativas sobre o desenvolvimento. Dessa forma, supõe-se que variações na composição química decorrentes do modo de processamento do material vegetal em laboratório possam ter desempenhado um papel importante. Sabe-se que o

processamento da erva-mate interfere na sua composição fitoquímica e, conseqüentemente, na composição dos extratos (ISOLABELLA *et al.*, 2010). Conforme Schmalko e Alzamora (2001), durante o processamento industrial da erva-mate cerca de 30 % da cafeína pode ser perdida, especialmente durante a secagem. Comparando a composição química de extratos aquosos de erva-mate bruta e comercial, Silva *et al.* (2011) verificaram valores significativamente maiores de saponinas totais, teobromina, cafeína e açúcares totais no extrato preparado com erva-mate bruta.

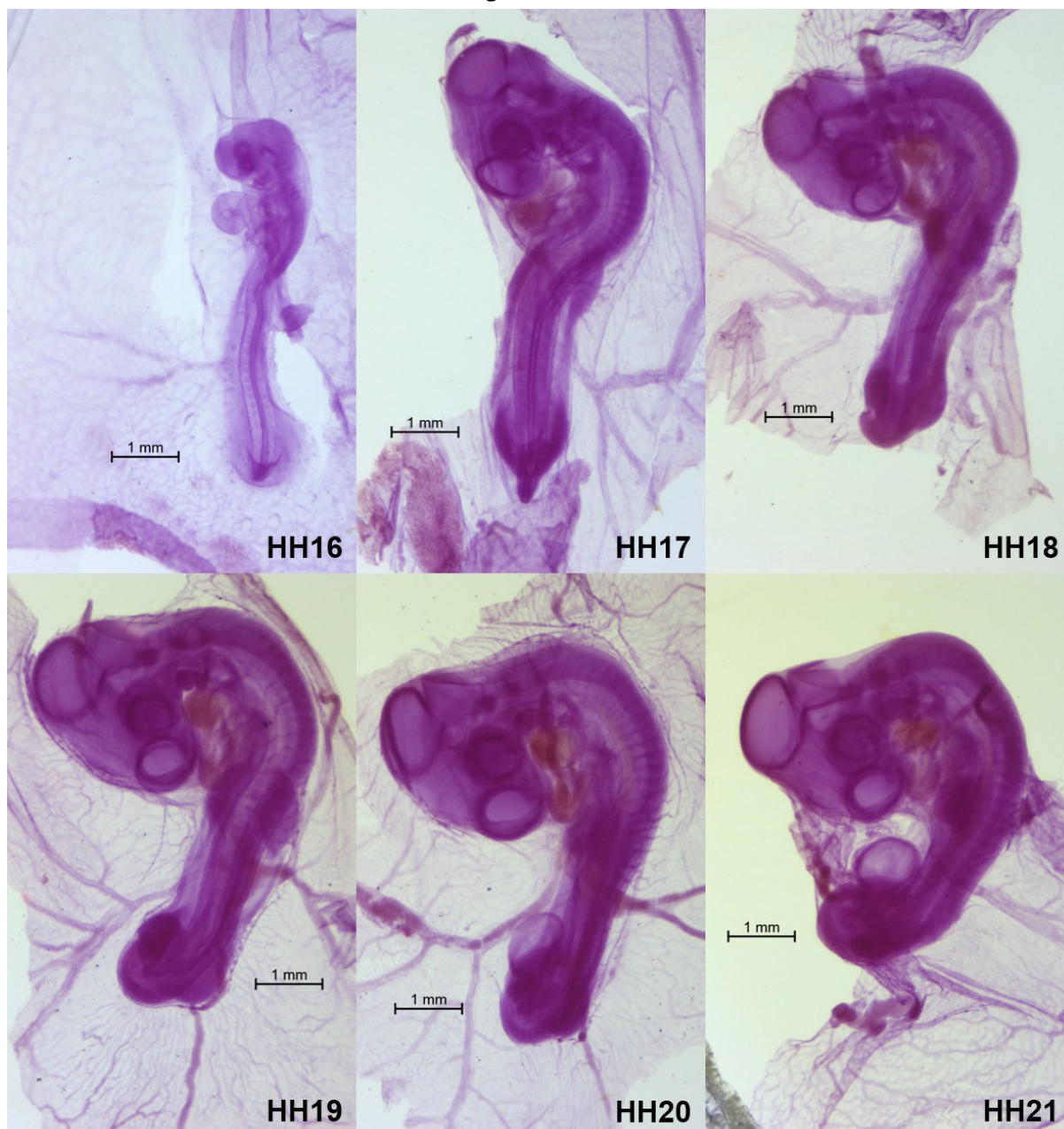
Figura 13 – Algumas das malformações mais representativas observadas em embriões de galinha-doméstica de três dias expostos ao extrato de erva-mate comercial



Nota – 1: embrião HH18 com raquisquise (seta); 2 e 3: embriões em estágio indeterminado devido a severas malformações; 4: embrião HH19 com agenesia caudal; 5: embrião HH19 com atrofia caudal (chave) e gastrosquise (cabeça de seta); 6: embrião HH18 com falha no fechamento do tubo neural na região cranial (setas), gastrosquise (cabeça de seta) e encurtamento da região posterior (chave).

Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Embriões de galinha-doméstica normais, montados em lâminas permanentes, em diferentes estágios de desenvolvimento



Nota – Os embriões pertencem aos grupos experimentais CF (HH18, 19 e 21); EP (HH16 e 20); e EC (HH17).

Fonte: Autoria própria.

Além disso, condições fisiológicas e ambientais também podem interferir quantitativamente sobre o perfil fitoquímico das plantas. Alguns trabalhos demonstram que diferentes condições de incidência luminosa, época de colheita e constituição do solo são importantes (COELHO *et al.*, 2007; RIACHI *et al.*, 2018; BUTIUK *et al.*, 2016; TOPPEL *et al.*, 2018). Como já mencionado, também pode haver uma ação sinérgica entre os componentes da planta. Contudo, considerando a falta de evidências concretas, o relativo atraso no desenvolvimento embrionário

observado em embriões expostos ao extrato de erva-mate bruta é tido como um efeito inespecífico, que precisa ser melhor compreendido através de estudos futuros.

Tabela 3 – Número de embriões por estágio de desenvolvimento e por grupo experimental

Grupo experimental	16	17	18	19	20	21	Média dos postos
Controle fechado (CF)	-	2	8	11	3	1	38,9600 ^a
Extrato de erva-mate comercial (EC)	-	3	5	7	-	-	31,5000 ^{ab}
Extrato de erva-mate bruta (EP)	3	3	11	6	1	-	26,3958 ^b

Nota – Médias seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a exposição a extratos de erva-mate bruta ou comercial não interfere nos parâmetros viabilidade dos ovos, sobrevivência embrionária e ocorrência de malformações em embriões de galinha-doméstica de três dias. Contudo, foi observada significativa redução na frequência cardíaca e relativo atraso no desenvolvimento de embriões expostos. Supõe-se que os efeitos observados sobre a resposta bradicárdica e o desenvolvimento embrionário tenham relação com os compostos químicos presentes nos extratos. Com relação ao atraso no desenvolvimento, haja vista que embriões do grupo exposto ao extrato de erva-mate comercial não demonstraram o mesmo resultado, acredita-se que os métodos de processamento da planta executados em laboratório possam ter sido influentes sobre a composição do extrato. Todavia, os mecanismos subjacentes aos efeitos observados ainda precisam ser melhor compreendidos.

Considerando a falta de informações relativas aos efeitos da erva-mate sobre o desenvolvimento embrionário, especialmente de vertebrados, recomenda-se que estudos mais robustos sejam conduzidos para avaliar essa relação e o modo de ação subjacente a esses processos a nível molecular, celular e sistêmico, através de métodos mais específicos, usando outros modelos experimentais e com números amostrais maiores e, portanto, mais representativos.

REFERÊNCIAS

- AGUNLOYE, O. M. *et al.* Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 109, p. 450-458, jan. 2019.
- AKIYAMA, R. *et al.* Heart rate responses to altered ambient oxygen in early (days 3–9) chick embryos in the intact egg. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 169, n. 2, p. 85-92, mar. 1999.
- ALBAS, C. S. *et al.* Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, Supl. I, p. 345-349, 2014.
- ALBERT, M. T. The effects of caffeine on the 4-day old chicken embryonic heart rate. In: MCLAUGHLIN, J.; MCCAIN, E. R. (ed.). **Developmental and physiological aspects of the chicken embryonic heart: a laboratory experience for undergraduate education**. Center Valley: Penn State Lehigh Valley, 2006. Disponível em: http://www2.lv.psu.edu/jxm57/chicklab/Mazin_Albert_Chick_Lab_2006.pdf. Acesso em: 12 nov. 2021.
- ANDERSSON, C.; GRIPENLAND, J.; JOHANSSON, J. Using the chicken embryo to assess virulence of *Listeria monocytogenes* and to model other microbial infections. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1155-1164, 2015.
- ANDRADE, F. *et al.* Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food and Chemical Toxicology** [s. l.], v. 50, n. 2, p. 328-334, fev. 2012.
- ARCAIN, B. M. S. **Efeito do Iprodiona (Rovral®) no desenvolvimento de *Gallus gallus***. 2017. 87 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017. Disponível em: <http://dspace.unila.edu.br/123456789/3463>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- ARCAIN, B. M. S. **Efeitos embriotóxicos do Rovral® durante a organogênese de embriões de galinha (*Gallus gallus*)**. 2020. 190 p. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020. Disponível em: <http://dspace.unila.edu.br/123456789/6035>. Acesso em: 16 nov. 2021.
- ARCAIN, B. M. S. *et al.* Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [s. l.], v. 84, n. 15, p. 632-648, 2021.
- BARBOZA, G. E. *et al.* Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. **Kurtziana**, Córdoba, v. 34, n. 1-2, p. 7-365, 2009.

- BASTOS, D. H. M. *et al.* Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 37-46, 2007.
- BEDNARCZYK, M. *et al.* Chicken embryo as a model in epigenetic research. **Poultry Science**, [s. l.], v. 100, n. 7, p. [1-12], jul. 2021. (Article 101164).
- BEKHET, G. M.; SAYED, A. A. Oregano-oil antagonist lipopolysaccharide (LPS) induced toxicity in pre- and post-hatch chick embryo. **Journal of Applied Animal Research**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 211-220, 2021.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **Atlas of chick development**. 3. ed. Oxford: Academic Press, 2014. 660 p.
- BENNETT, C. E. *et al.* The broiler chicken as a signal of a human reconfigured biosphere. **Royal Society Open Science**, London, v. 5, n. 12, p. [1-11], dez. 2018. (Article ID: 180325).
- BERTÉ, K. A. S. **Tecnologia da erva-mate solúvel**. 2011. 160 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/26312>. Acesso em: 07 out. 2021.
- BERTÉ, K. A. S. *et al.* Antioxidant activity of maté tea and effects of processing. *In*: PREEDY, V. (ed.). **Processing and impact on antioxidants in beverages**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 145-153.
- BJØRNSTAD, S. *et al.* Cracking the egg: potential of the developing chicken as a model system for nonclinical safety studies of pharmaceuticals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v. 355, n. 3, p. 386-396, dez. 2015.
- BORGES, M. E. **Uso do embrião de ave (*Gallus gallus*) como organismo modelo para embriotoxicidade do chumbo e arsênio**. 2018. 102 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/55799>. Acesso em: 14 nov. 2021.
- BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 378-384, jul. 2011.
- BRACESCO, N. *et al.* Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of *Ilex paraguariensis* infusion and its component rutin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 51, n. 9, p. [1-8], 2018. (e7404).
- BRAGANÇA, V. L. C.; MELNIKOV, P.; ZANONI, L. Z. Trace elements in different brands of yerba mate tea. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 144, n. 1-3, p. 1197-1204, dez. 2011.
- BRANDT, M.; SILVA, N. S. A coleta da erva-mate pela população cabocla do Vale do Rio do Peixe e Oeste de Santa Catarina: apropriação privada da terra e rupturas

(décadas de 1900 a 1940). **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 459-469, set./dez. 2014.

BRUYERE JUNIOR, H. J. *et al.* The effects of cardioteratogenic doses of caffeine on cardiac function in the 3-day chick embryo. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 197-203, 1987.

BURGOS, A. M.; MEDINA, R. D. Origen e historia: idas y vueltas de la infusión nacional. *In*: CAPELLARI, P. L. (coord.). **Yerba mate**: reseña histórica y estadística. Producción e industrialización en el siglo XXI. Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones, 2017. p. 13-20.

BURRIS, K. P. *et al.* Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 72, n. 2, p. 268-274, abr./jun. 2012.

BUTIUK, A. P. *et al.* Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 27-33, mar. 2016.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – a review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 21, p. 440-454, mar. 2016.

CARLSON, B. M. **Human embryology and developmental biology**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2019.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, v. 1).

COELHO, G. C. *et al.* Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 75-80, fev. 2007.

COSTA, M. C. V. *et al.* Lead exposure affects cephalic morphogenesis and neural crest cells in *Gallus gallus* embryo. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 84, mar./abr. 2021. (106948).

CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 78, n. 5, p. [1-11], 2021. (e20190259).

CRUZ, M. P. *et al.* Action of *Ganoderma lucidum* mycelial growth filtrates on *Erysiphe diffusa* and embryotoxicity assessment in a chicken embryo model. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v. 65, n. 1, p. 47-57, 2021.

DAVEY, M. G.; TICKLE, C. The chicken as a model for embryonic development. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 117, n. 1-4, p. 231-239, jul. 2007.

DE BEER, G. (ed.). Darwin's notebooks on transmutation of species: Part II. Second notebook (February to July 1838). **Bulletin of the British Museum (Natural History), Historical Series**, London, v. 2, n. 3, p. 75-118, 1960.

DEBIASI, M. M. **Análise morfológica da ação do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus***. 2011. 49 f. Monografia (Especialização em Biologia Celular e Tecidual) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/32798>. Acesso em: 14 nov. 2021.

DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. El mate. **Revista de Fitoterapia**, Carlet, v. 1, n. 4, p. 269-278, 2001.

DELLACASSA, E. *et al.* Yerba mate. Historia, uso y propiedades. **Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay**, Montevideo, v. 51, p. 16-20, 2007.

DE MENDIBURU, F. **agricolae**: statistical procedures for agricultural research. Versão 1.3-5. [S. l.]: [s. n.], 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=agricolae>. Acesso em: 06 nov. 2021.

DOTY, M. Hamburger-Hamilton staging series (1951). *In*: **EMBRYO PROJECT. Embryo Project Encyclopedia**. Arizona State University: Tempe, 2011. Disponível em: <http://embryo.asu.edu/handle/10776/2280>. Acesso em: 11 nov. 2021.

DUARTE, J. *et al.* Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 117-124, maio 2001.

DURAI SWAMI, P. K. Insulin-induced skeletal abnormalities in developing chickens. **British Medical Journal**, London, v. 2, n. 4675, p. 384-390, ago. 1950.

ELY, J. O.; ROSS, M. H. Nucleic acids and the Feulgen reaction. **The Anatomical Record**, Philadelphia, v. 104, n. 1, p. 103-123, maio 1949.

FENSTER, L. *et al.* Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 81, n. 4, p. 458-461, abr. 1991.

FÉRÉ, C. Note sur l'influence des injections de liquides dans l'albumen sur l'incubation de l'oeuf de poule. **Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de Biologie**, Paris, ser. 9, t. 5, p. 787-789, 1893. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/32309845>. Acesso em: 04 nov. 2021.

FÉRÉ, C. Tératogénie expérimentale et pathologie générale. **Cinquantenaire de la Société de Biologie**, Paris, v. jubilaire, p. 360-369, 1899. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/32346208>. Acesso em: 04 nov. 2021.

FOLCH, C. Stimulating consumption: yerba mate myths, markets, and meanings from conquest to present. **Comparative Studies in Society and History**, Ann Arbor, v. 52, n. 1, p. 6-36, jan. 2010.

FONSECA, C. A. *et al.* Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of *mate-chimarrão* (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 333-346, 2000.

FRANKE, K. W. *et al.* Monstrosities produced by the injection of selenium salts into hens' eggs. **The Anatomical Record**, Salt Lake City, v. 65, n. 1, p. 15-22, abr. 1936.

GAWRON-GZELLA, A.; CHANAJ-KACZMAREK, J.; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba mate — a long but current history. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. [1-20], 2021. (3706).

GERHARDT, M. **História ambiental da erva-mate**. 2013. 290 p. Tese (Doutorado em História) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/107480>. Acesso em: 06 out. 2021.

GIACOMINI, F. *et al.* Ecofriendly dyeing of silk with extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Textile Research Journal**, [s. l.], v. 87, n. 7, p. 829-837, 2017.

GIBERTI, G. C. Maté (*Ilex paraguariensis*). In: HERNÁNDEZ BERMEJO, J. E.; LEÓN, J. (ed.) **Neglected crops: 1492 from a different perspective**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1994. p. 245-252. (FAO Plant Production and Protection Series n. 26).

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

GUSTAFSSON, S. B.; JACOBSSON, S. O. P. Effects of cannabinoids on the development of chick embryos *in ovo*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, p. [1-8], 2019. (Article number: 13486).

GULLÓN, B. *et al.* Yerba mate waste: a sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 113, p. 398-405, mar. 2018.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 49-92, jan. 1951.

HAMMETT, F. S.; WALLACE, V. L. Studies in the biology of metals: VII. The influence of lead on the development of the chick embryo. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 48, n. 5, p. 659-665, nov. 1928.

HAWKINS, J. A.; HU, N.; CLARK, E. B. Effect of caffeine on cardiovascular function in the stage 24 chick embryo. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 334-343, 1984.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. R138-R151, nov./dez. 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 18, p. 8394-8403, set. 2008.

HEINRICH-HIRSCH, B.; NEUBERT, D. Effect of aciclovir on the development of the chick embryo in ovo. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 402-408, jul. 1991.

HEMMINKI, K. Toxicity of rubber chemicals in the chicken embryo: how to interpret results from animal tests. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, Helsinki, v. 9, Supl. 2, p. 73-77, 1983.

HENSHEL, D. S.; DEWITT, J.; TROUTMAN, A. Using chicken embryos for teratology studies. **Current Protocols in Toxicology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. [13.4.1- 13.4.19], nov. 2002. (Unity 13.4).

HILL, E. F.; HOFFMAN, D. J. Avian models for toxicity testing. **Journal of the American College of Toxicology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 357-376, nov. 1984.

HUMASON, G. L. **Animal tissue techniques**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1962. (A Series of Biology Books). Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/5890>. Acesso em: 14 dez. 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Drinking coffee, mate, and very hot beverages**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2018. 499 p. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 116).

IOMMI, C. **Chemistry and safety of South American yerba mate teas**. Cham: Springer, 2021. 84 p. (SpringerBriefs in Molecular Science).

ISOLABELLA, S. *et al.* Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 695-699, out. 2010.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1336, n. 2, p. 323-330, ago. 1997.

JAMIESON, R. W. The essence of commodification: caffeine dependencies in the early modern world. **Journal of Social History**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 269-294, winter 2001.

JARAMILLO, C. M. *et al.* Biodegradability and plasticizing effect of *yerba mate* extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 151, p. 150-159, out. 2016.

JELINEK, R. Use of chick embryo in screening for embryotoxicity. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, [s. l.], v. 2, n. 3-4, p. 255-261, 1982.

KAEZER, A. R. *et al.* Antimutagenic effect and phenolic content of green and roasted yerba mate beverages in different packages available in the Brazilian market. **CyTA - Journal of Food**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 144-151, maio 2012.

KAIN, K. H. *et al.* The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 243, n. 2, p. 216-228, fev. 2014.

KHOSRAVI, A. *et al.* Embryonic toxico-pathological effects of meglumine antimoniate using a chick embryo model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. [1-20], 2018. (e0196424).

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*)**. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/56771>. Acesso em: 24 out. 2021.

KMECICK, M. *et al.* Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, [s. l.], v. 427, p. [1-8], nov. 2019. (Article 152286).

KNAPP, M. A. *et al.* Yerba mate extract in active starch films: mechanical and antioxidant properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. [1-12], mar. 2019. (e13897).

KUJAWSKA, M. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) beverage: nutraceutical ingredient or conveyor for the intake of medicinal plants? Evidence from Paraguayan folk medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2018, p. [1-17], 2018. (Article ID 6849317).

LAWAL, R. A.; HANOTTE, O. Domestic chicken diversity: origin, distribution, and adaptation. **Animal Genetics**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 385-394, ago. 2021.

LAWAL, R. A. *et al.* The wild species genome ancestry of domestic chickens. **BMC Biology**, London, v. 18, p. [1-18], 2020. (Article number: 13).

LEITÃO, A. C.; BRAGA, R. S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 7, p. 1517-1525, 1994.

LIMA, M. E. *et al.* Protective effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) against oxidative damage *in vitro* in rat brain synaptosomal/mitochondrial P2 fractions. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 34, p. 447-452, jul. 2017.

LIMA, U. A. Bebidas estimulantes. *In*: VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). **Bebidas não alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher, 2010. p. 39-56. (Bebidas, v. 2).

LIU, Y.-P. *et al.* Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 12-19, jan. 2006.

LÓPEZ, A. The economics of yerba mate in seventeenth-century South America. **Agricultural History**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 493-509, out. 1974.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and *yerba mate* consumption: a review of possible associations. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 25, n. 6, p. 530-539, 2009.

MCLAUGHLIN JUNIOR, J. *et al.* The injection of chemicals into the yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 5, n. 6, p. 760-771, nov. 1963.

MEINHART, A. D. *et al.* Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2188-2193, 2010.

METE, M. *et al.* Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development. **Child's Nervous System**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1715-1719, set. 2016.

MIRANDA, D. D. C. *et al.* Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 261-265, jul. 2008.

MOMOI, N. *et al.* Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 294, n. 5, p. H2248-H2256, maio 2008.

MORAES, M. *et al.* Relación entre el consumo de mate en el embarazo con el peso al nacer. **Archivos de Pediatría del Uruguay**, Montevideo, v. 85, n. 1, p.18-24, 2014.

NAKAZAWA, M. *et al.* Developmental hemodynamic changes in rat embryos at 11 to 15 days of gestation: normal data of blood pressure and the effect of caffeine compared to data from chick embryo. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 200-205, fev. 1988.

OELLIG, C.; SCHUNCK, J.; SCHWACK, W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1533, p. 208-212, jan. 2018.

OKARU, A. O. *et al.* Comparative oesophageal cancer risk assessment of hot beverage consumption (coffee, mate and tea): the margin of exposure of PAH vs very hot temperatures. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 18, p. [1-13], 2018. (Article number: 236).

OLIVEIRA, G. S. *et al.* Clove essential oil in the sanitation of fertile eggs. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 5509-5516, nov. 2020.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *In*: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Embrapa Florestas (EMBRAPA-CNPQ), 1985. p. 17-36. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/300244>. Acesso em: 06 out. 2021.

ORANUBA, E. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons as a potential source of carcinogenicity of mate. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, London, v. 37, n. 1, p. 26-41, 2019.

ORTOLANI-MACHADO, C. F. *et al.* Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. *In*: RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. São Paulo: Santos, 2012. p. 237-294.

PEGORARO, J. *et al.* The relationship between the consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and the presence of micronuclei in the oral mucosa. **Journal of International Oral Health**, Mumbai, v. 10, n. 5, p. 262-266, set./out. 2018.

PETERS, J. *et al.* Holocene cultural history of Red jungle fowl (*Gallus gallus*) and its domestic descendant in East Asia. **Quaternary Science Reviews**, [s. l.], v. 142, p. 102-119, jun. 2016.

PINTO, B. G. S. **Análise da toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L. 1758)**. 2020. 80 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/25639>. Acesso em: 16 nov. 2021.

PORTER, R. H. Maté — South American or Paraguay tea. **Economic Botany**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 37-51, jan. 1950.

PUANGPRAPHANT, S.; MEJIA, E. G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 19, p. 8873-8883, out. 2009.

RANA, N. *et al.* Caffeine-induced effects on heart rate in zebrafish embryos and possible mechanisms of action: an effective system for experiments in Chemical Biology. **Zebrafish**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 69-81, mar. 2010.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Versão 4.1.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org>. Acesso em: 30 out. 2021.

RIACHI, L. G. *et al.* Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in *maté* extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 266, p. 317-322, nov. 2018.

ROLÓN, P. A. *et al.* Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 4, n. 6, p. 595-605, set. 1995.

ROMERO, M. *et al.* Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 627, n. 1-3, p. 242-250, 2010.

ROSA, P. S.; AVILA, V. S. **Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte**. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, 2000. 3 p. (Comunicado Técnico, 246). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58383/1/CUsersPiazzonDocuments246.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2021.

RSTUDIO TEAM. **RStudio**: integrated development environment for R. Versão 1.4.1717. Boston: RStudio, 2021. Disponível em: <https://www.rstudio.com>. Acesso em: 30 out. 2021.

SAINT-HILAIRE, A. Aperçu d'un voyage dans l'intérieur du Brésil, la province Cisplatine et les Missions dites du Paraguay. **Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 9, p. 307-380, 1822.

SAMPAIO, J. *et al.* Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 4, p. 462-467, out./dez. 2012.

SANTETTI, G. S. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves on dough properties, antioxidant activity, and bread quality using whole wheat flour. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 86, n. 10, p. 4354-4364, out. 2021.

SANTOS, I. S.; MATIJASEVICH, A.; VALLE, N. C. J. Maté drinking during pregnancy and risk of preterm and small for gestational age birth. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 135, n. 5, p. 1120-1123, maio 2005.

SARAIVA, B. R. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) addition on the functional and technological characteristics of fresh cheese. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 1256-1265, mar. 2019.

SARREAL, J. The many meanings of yerba mate: across borders, sharing a Guarani drink. **ReVista: The Harvard Review of Latin America**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 12-14, primavera 2015.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing. **Drying Technology**, [s. l.], v. 19, n. 3-4, p. 599-610, 2001.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology. In: MOODY, S. A. (ed.). **Cell lineage and fate determination**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 429-436.

SEHNEM, S.; VELTRINI, V. C. O chimarrão e suas repercussões bucais. **Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 5, n. 3, p. 447-453, set./dez. 2012.

SILVA, R. D. *et al.* The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 818-826, set. 2011.

SMALL, E.; CATLING, P. M. Blossoming treasures of biodiversity: 3. Maté (*Ilex paraguariensis*) - better than Viagra, marijuana, and coffee? **Biodiversity**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 26-27, 2001.

SMITH, S. M.; FLENTKE, G. R.; GARIC, A. Avian models in teratology and developmental toxicology. In: HARRIS, C.; HANSEN, J. M. (ed.). **Developmental toxicology: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2012. p. 85-103. (Methods in Molecular Biology, v. 889).

SOUSA, W. R. *et al.* Evaluation of reproductive toxicology of aqueous extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), a traditional South American beverage. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 97-101, jan. 2019.

STEIL, G. J. **Teratogênese e estresse oxidativo em embriões de *Gallusgallus* expostos ao cádmio**. 2013. 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/32185>. Acesso em: 14 nov. 2021.

STERN, C. D. The chick embryo – past, present and future as a model system in developmental biology. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 121, n. 9, p. 1011-1013, set. 2004.

STERN, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 9-17, jan. 2005.

STERN, C. D. The chick model system: a distinguished past and a great future. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 62, n. 1/2/3, p. 1-4, 2018.

STRASSMANN, B. B. *et al.* Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 18, p. 8348-8353, set. 2008.

SUCHAL, K. *et al.* Molecular pathways involved in the amelioration of myocardial injury in diabetic rats by kaempferol. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. [1-17], maio 2017.

TOPPEL, F. V. *et al.* Soil chemical attributes and their influence on elemental composition of yerba mate leaves. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 425-434, jul./set. 2018.

VAINIO, O.; IMHOF, B. A. The immunology and developmental biology of the chicken. **Immunology Today**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 365-370, ago. 1995.

VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural Development**, [s. l.], v. 7, p. [1-19], 2012. (Article number: 22).

VISMARA, L. S. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea* in vitro e ação toxicológica**. 2019. 212 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4517>. Acesso em: 01 nov. 2021.

VOGTHERR, M. (ed.). **Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte**: atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British Pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of Amerika. Gera-Untermhaus: Franz Eugen Köhler, 1898. v. 3. Volume suplementar.

WANG, C. *et al.* Imidacloprid exposure suppresses neural crest cells generation during early chick embryo development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 23, p. 4705-4715, 2016.

WANG, D. *et al.* Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 132, p. [1-8], dez. 2020. (Article 110773).

WANG, M.-S. *et al.* 863 genomes reveal the origin and domestication of chicken. **Cell Research**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 693-701, ago. 2020.

WARMLING, J. V. **Efeitos letais e subletais de extratos vegetais alcoólicos sobre *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2018. 77 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4385>. Acesso em: 29 out. 2021.

WNUK, M. *et al.* Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 679, n. 1-2, p. 18-23, set./out. 2009.

WOLPERT, L. Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 121, n. 9, p. 1015-1017, set. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles for the testing of drugs for teratogenicity**: report of a WHO scientific group. Geneva: WHO, 1967. 18 p. (World Health Organization technical report series n. 364). Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40657>. Acesso em: 05 nov. 2021.

YAMAMOTO, F. Y. **Padronização de metodologias aplicadas ao estudo da exposição de embriões de aves a contaminantes ambientais**. 2009. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/30157>. Acesso em: 12 nov. 2021.

YAMAMOTO, F. Y. *et al.* Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 548-555, set. 2012.

ZEILEIS, A.; HOTHORN, T. Diagnostic checking in regression relationships. **R News**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 7-10, dez. 2002.

ZINABADINOVA, S. *et al.* Effects of technogenic pollutants on chicken embryos. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, Lublin, v. 31, n. 1, p. 34-38, 2018.