

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

SILVANE ZANCANARO DE OLIVEIRA

**TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA A ORGANISMOS NÃO-
ALVO**

DOIS VIZINHOS-PR

2023

SILVANE ZANCANARO DE OLIVEIRA

TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA A ORGANISMOS NÃO-ALVO

Toxicity of melaleuca essential oil to non-target organism

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Michele Potrich.

Coorientador(a): Patrícia Franchi de Freitas

DOIS VIZINHOS-PR

2023



[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.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos**



SILVANE ZANCANARO DE OLIVEIRA

TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA A ORGANISMOS NÃO-ALVO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Agroecossistemas.

Data de aprovação: 28 de Fevereiro de 2023

Dra. Michele Potrich, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Andre Luiz Da Silva, Doutorado - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná (Ifpr)

Dra. Lilian De Souza Vismara, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Patricia Franchi De Freitas, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/02/2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e muita saúde para que eu pudesse estar em pé nesta caminhada.

Agradeço ao meu esposo Adenilson de Oliveira pela paciência, força de incentivo mesmo na vontade de desistir me deu forças para que eu pudesse continuar.

Aos meus filhos Raissa Karine de Oliveira e Eliezer de Oliveira por entenderem minha ausência.

Agradeço aos meus pais Juvenil e Ironi Zancanaro que sempre me colocaram em oração para que eu tivesse força para poder continuar esta caminhada e tornar meu sonho concretizado. Aos meus irmãos Sidiane Zancanaro Ghizzi, Sidivane Zancanaro Guancino, Miqueias José Zancanaro e Siluane Zancanaro pelo incentivo e motivação, amo muito vocês.

Agradeço principalmente a minha orientadora Doutora Michele Potrich por ter me sugerido este trabalho tão lindo e principalmente por me indicar o caminho correto para que fosse possível o desenvolvimento deste trabalho e sem medir esforços em passar seus conhecimentos.

Agradeço a minha coorientadora Patrícia Freitas Franchi pelos ensinamentos, pela amizade, paciência de me ouvir e me incentivar, por ser exemplo de pessoa alegre e determinada, saiba que você sempre estará no meu coração.

Agradeço ao professor Edgar Vismara pelo companheirismo e orientação e na estatística.

Agradeço a minha amiga Elizabete Artus Berte por acompanhar todo o experimento e dar várias sugestões por compartilhar as alegrias, fazendo com que as horas passassem tão rápido que nem percebesse.

Agradeço aos meus amigos e familiares que de alguma forma estiveram presente nesse momento me incentivando, trazendo palavras de apoio, compartilhando alegrias e dificuldades. Muito obrigada pela amizade e por fazer parte da minha.

Enfim, meu agradecimento a todos que contribuíram para a elaboração desse trabalho.

“Se estiver sem forças, lute;
Se estiver sem fé, acredite;
Se todos estiverem rindo de você, supere-se;
Se seus inimigos estão vencendo, surpreenda;
Se estiver com medo, enfrente;
Só vencemos o que enfrentamos!”

Vitor Rafael

RESUMO

O aumento dos cultivos em agroecossistemas favorece o surgimento de insetos-praga, com isso, há aumento na utilização de inseticidas sintéticos. Ao analisar formas de controlar estes insetos-pragas, sem que ocasionem danos aos organismos não-alvo e ao ambiente, procura-se meios mais seletivos ou seguros. Nesse sentido, tem-se estudado e empregado o uso de inseticidas botânicos como o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. No entanto, os efeitos dos óleos essenciais sobre abelhas e mamíferos são pouco conhecidos. Neste sentido, objetivou-se avaliar a possível toxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia* (OEMA) sobre dois modelos biológicos, um invertebrado *Apis mellifera* africanizada (abelha) e um vertebrado, o embrião de *Gallus gallus domesticus* (galinha). Para isto, foi utilizada a concentração de 0,75% do OEMa em ambos os experimentos com os modelos biológicos. Em abelhas foram três tipos de exposição: 1) pulverização indireta do OEMa nas abelhas; 2) pulverização direta do OEMa nas abelhas; 3) OEMa incorporado na alimentação. As análises foram: probabilidade de sobrevivência, teste de deslocamento vertical (voo) e retomada de voo (queda) das abelhas. O OEMa quando pulverizado diretamente sobre as operárias de *A. mellifera* reduziu a probabilidade de sobrevivência destas após 120 horas. No bioensaio com vertebrados, os embriões de *G. gallus* foram submetidos a dois tipos de exposição: 1) Pulverização externa do OEMa no ovo de *G. gallus*; 2) Injeção de OEMa na parte interna do ovo de *G. gallus*. Foram realizadas as análises: viabilidade, probabilidade de sobrevivência, taxa de batimentos cardíacos, ocorrência de má-formações e estádios de desenvolvimento dos embriões de *G. gallus*. A exposição ao OEMa injetado no ovo afetou negativamente *G. gallus*, causando má-formações com três dias de incubação. Conclui-se que o OEMa é seletivo e seguro tanto para as abelhas (desde que pulverizado em horário com menos atividades de *A. mellifera*) quanto para os embriões de *G. gallus* (pulverizado externamente no ovo).

Palavras-chave: *Apis mellifera*; seletividade; *Gallus gallus*; *Melaleuca alternifolia*.

ABSTRACT

The increase in crops in agroecosystems favors the emergence of insect pests, with this, there is an increase in the use of synthetic insecticides. When analyzing ways to control these insect pests without causing damage to non-target organisms and the environment, more selective or safer means are sought. In this sense, the use of botanical insecticides such as the essential oil of *Melaleuca alternifolia* has been studied and used. However, the effects of essential oils on bees and mammals are little known. In this sense, the objective was to evaluate possible toxicity of the essential oil of *M. alternifolia* (OEMa) on two biological models, an invertebrate *Apis mellifera* africanizada (bee) and a vertebrate, the embryo of *Gallus gallus domesticus* (hen). For this, a concentration of 0.75% of OEMa was used in both experiments with biological models. In bees there were three types of exposure: 1) indirect spraying of OEMa in bees; 2) direct spraying of OEMa on bees; 3) OEMa incorporated into the feed. The analyzes were: probability of survival, vertical displacement test (flight) and flight resumption (fall) of the bees. The OEMa, when sprayed directly on *A. mellifera* workers, reduced their probability of survival after 120 hours. In the bioassay with vertebrates, the embryos of *G. gallus* were submitted to two types of exposure: 1) external spraying of OEMa on the egg of *G. gallus*; 2) Injection of OEMa into the inside of the *G. gallus* egg. Analyzes were carried out: viability, probability of survival, heart rate, occurrence of malformations and stages of development of *G. gallus* embryos. Exposure to OEMa injected into the egg negatively affected *G. gallus*, causing malformations within three days of incubation. OEMa is selective and safe both for bees (provided it is sprayed at times when *A. mellifera* is less active) and for *G. gallus* embryos (sprayed externally on the egg).

Keywords: *Apis mellifera*; Selectivity; *Gallus gallus*; *Melaleuca alternifolia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> (MYRTACEAE) A <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)	20
Figura 1- Tratamentos de pulverização indireta: (A) Pulverização dos tratamentos dentro da placa de petri esterilizada; (B) Abelhas anestesiadas com CO ₂ sendo alocadas dentro das placas de petri já contendo o tratamento.....	24
Figura 2- (A) Gaiolas de PVC contendo <i>A. mellifera</i> já tratadas e com alimento dispostas em sala de criação. (B) Recipiente de plástico com tela antiafídica na borda com alimento para <i>A. mellifera</i>	24
Figura 3- Pulverização direta do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>Apis mellifera</i>	25
Figura 4- Torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo. (A) torre utilizada para teste voo e queda, (B) modelo de torre com mensurações dos estratos.....	27
Figura 5- Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada após pulverização indireta dos tratamentos.....	29
Figura 6- Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada após pulverização direta dos tratamentos.....	30
Figura 7- Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada após ingestão dos tratamentos	30
Figura 8: Probabilidade de sobrevivência das operárias de <i>Apis mellifera</i> após serem submetidos aos tratamentos em diferentes exposições	31
Figura 9- Retomada de voo de <i>Apis mellifera</i> africanizada após tratamentos, comparações múltiplas de verossimilhança e qui-quadrado	32
Figura 10- Deslocamento vertical de <i>Apis mellifera</i> africanizada após tratamentos, comparações múltiplas de verossimilhança e qui quadrado	33
CAPÍTULO II AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> SOBRE O MODELO BIOLÓGICO <i>Gallus gallus domesticus</i>	40
Figura 1 - Representação esquemática do ovo de <i>Gallus gallus</i> . A: partes do ovo. B: Injeção do tratamento na câmara de ar do ovo de <i>G. gallus</i>	43
Figura 2- Aplicação de soluções nos ovos; A- injeção de solução no ovo; B- Pulverização externa no ovo	44
Figura 3- coleta do embrião, (A) embrião alocado no cassete para recebimento de fixador, (B) embrião já na solução fixadora de Carnoy	45
Figura 4 – Viabilidade dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> quando testados com o óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas diferentes metodologias (pulverização e injeção)	47
Figura 5 – Probabilidade de sobrevivência dos embriões de <i>G. gallus</i> submetido aos tratamentos contendo Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	48

Figura 6 – Taxa de batimentos cardíacos dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetido a tratamentos contendo Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	48
Figura 7 – Probabilidade de ocorrência de má-formação em embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> após tratamento com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	49
Figura 8 – Comparação de diferentes estádios dos embriões de <i>G. gallus domesticus</i> sem anomalias. (A) estágio 17 do embrião; (B) estágio 18 do embrião; (C) estágio 19 do embrião	50
Figura 9 – Comparação de diferentes má-formações de <i>G. gallus domesticus</i>. (A) Embrião com gastrosquise; (B) Embrião com escoliose lombar; (C) Embrião com má formação generalizada; (D) Embrião com raquisquise, região cefálica com má formação severa; (E) Embrião com trofia caldal; (F) Embrião com raquisquise caudal	51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> (MYRTACEAE) A <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)	20
Tabela 1 - Método de exposição, tratamentos e soluções, para a análise de toxicidade do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> a operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada	23
CAPÍTULO II AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> SOBRE O MODELO BIOLÓGICO <i>Gallus gallus domesticus</i>	40
Tabela 1 - Grupos experimentais com tratamentos para avaliação toxicológica de <i>Melaleuca</i> a <i>G. gallus</i>	42
Tabela 2 - Número de embriões por estágio de desenvolvimento e por grupo experimental	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Agroecossistemas	11
2.2 Inseticidas botânicos nos agroecossistemas	11
2.2.1 OE de <i>Melaleuca alternifolia</i>	12
2.3 Invertebrados e Vertebrados nos agroecossistemas	13
2.3.1 Importância das abelhas nos agroecossistemas.....	15
2.3.2 Embriotoxicologia	17
I TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA (MYRTACEAE) A APIS MELLIFERA L. (HYMENOPTERA: APIDAE)	20
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Pulverização indireta do óleo essencial de melaleuca sobre operárias de <i>A. mellifera</i>	23
2.2 Pulverização direta de óleo essencial de melaleuca sobre operárias de <i>A. mellifera</i>	25
2.3 Toxicidade, por alimentação, do óleo essencial de melaleuca sobre <i>Apis mellifera</i>	26
2.4 Teste de voo (deslocamento vertical) e teste de queda (retomada do voo)	26
2.5 Análise estatística	27
3 RESULTADOS	29
3.1 Pulverização indireta, direta e alimentação de operárias de <i>A. mellifera</i> com óleo essencial de melaleuca	29
3.2 Teste de deslocamento vertical (Voo) e Retomada de Voo (queda)	31
4 DISCUSSÃO	34
5 CONCLUSÃO	39
II AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA SOBRE O MODELO BIOLÓGICO <i>GALLUS GALLUS DOMESTICUS</i>	40
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Testes toxicológico em embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i>	42
2.1.1 Método de exposição	43
2.1.2 Avaliações da frequência cardíaca	44

2.1.3 Análise morfológica	44
2.2 Análise estatística	46
3 RESULTADOS.....	47
3.1 Teste toxicológico do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> nos métodos de pulverização (externo) e injeção (interno)	47
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÃO	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS.....	13

1 INTRODUÇÃO

Parte do território brasileiro, em média 35%, é recoberto por paisagens agrícolas e agroecossistemas (WORLD BANK, 2018). A maioria dessas áreas é cultivada com as culturas do algodão, amendoim, arroz, aveia, canola, centeio, cevada, feijão, girassol, mamona, milho, soja, sorgo, trigo e triticale (CAMPOS *et al.*, 2018; CONAB, 2022).

Agroecossistemas podem ser definidos como sistemas ecológicos modificados pelo ser humano, a fim de produzir alimentos ou outro tipo de produto agrícola. Frequentemente, possuem estrutura dinâmica e complexa. Sua complexidade surge, primeiramente, da interação entre os processos socioeconômicos e ecológicos (CONWAY, 1987).

A demanda em aumentar o cultivo nesses agroecossistemas favorece o surgimento de pragas, com isso utiliza-se maior quantidade de agrotóxicos, também conhecidos como produtos fitossanitários sintéticos (PFS), com o objetivo de controlar estas pragas (MARTINEZ, 2017). Tem sido preocupante o uso exacerbado e incorreto destes agrotóxicos, soma-se ainda que os resíduos destes produtos podem permanecer nos alimentos e no ambiente, resultando em danos à flora e à fauna (PIMENTEL, *et al.*, 1992; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; FERNANDO, *et al.*, 2021).

Ao analisar formas de controlar estas pragas (que podem ser insetos, ácaros, fitopatógenos, plantas daninhas, etc.), sem que ocasionem danos aos organismos não-alvo e ao ambiente, procura-se meios mais seletivos ou seguros. Nesse sentido, tem-se empregado o uso de inseticidas botânicos, isto é, produtos naturais de origem vegetal (BETTIOL, 2006; VIANA, *et al.*, 2018; STENGER, *et al.*, 2021). Os inseticidas botânicos apresentam componentes voláteis que podem atuar como repelente ou até mesmo causando a mortalidade de insetos, impedindo que se alimentem ou ainda interferindo na sua reprodução (PETERS, 2016). Pelo fato dos inseticidas botânicos terem poder de controlar várias pragas, patógenos e alguns terem potencial medicinal, torna de grande interesse a investigação dos efeitos causadores destas substâncias em vertebrados e invertebrados (STEFFEN, 2019).

Um dos inseticidas botânicos utilizados é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* L., 1758, conhecida como árvore-do-chá (*tea tree*) da família Myrtaceae. Ela é de origem australiana, tem efeitos antibactericida e antifúngico comprovados.

O óleo desta planta é extraído, principalmente, das folhas por hidrodestilação ou destilação (GUSTAFSON, *et al.*, 1998; OLIVEIRA, FONTANA, *et al.*, 2011; LEONARDI; BERNARDO, 2020). Óleo essencial de melaleuca é um inseticida botânico, porém existe a hipótese de que possa causar alterações em organismos não-alvo, como na abelha *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), e em vertebrados fazendo com que possa alterar seu comportamento causando a morte.

As abelhas, como polinizadoras, frequentemente, visitam culturas que foram manejadas e receberam tratamentos fitossanitários. Ao serem expostas ao tratamento, elas podem se contaminar e levar o contaminante até a colônia ou morrer ainda no campo. Como alguns agricultores, normalmente, apresentam apiários em suas propriedades e empregam o uso de inseticidas botânicos para controlar os insetos-pragas da cultura, é importante avaliar o possível efeito que estes produtos podem ter sobre as abelhas *A. mellifera*, que são organismos não-alvo, e servem de modelo para estudos de toxicologia e também são bioindicadores ambientais (PAPA, *et al.*, 2018; MAIER, *et al.*, 2022). *Apis mellifera* é um bioindicador eficiente para metais pesados, relacionados a qualidade do ar (FIORE; NUZZO, *et al.*, 2022).

Além das abelhas, outros organismos não-alvo interagem no agroecossistema que recebe os tratamentos, sendo importante avaliar os efeitos também em vertebrados. Nesse sentido, o uso do embrião de ave é considerado uma ferramenta valiosa, pois permite extrapolar os efeitos causados por diferentes inseticidas, como os botânicos, sobre o desenvolvimento embrionário (SCHOENWOLF, 1999; SEFCIKOVA; BABEL'OVA, *et al.*, 2018). Os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e humanos se assemelham (MOORE & PERSAUD, 2008), permitindo extrapolar os resultados quanto aos riscos da exposição humana a agentes contaminantes (BASU *et al.*, 2013; FARHAT, *et al.*, 2013; HEID, *et al.*, 2001; PARWEEN; RAMANATHAN, *et al.*, 2021).

O uso do óleo essencial de melaleuca embora tenha muitas finalidades como o uso medicinal, ainda é pouco explorado para finalidades agrícolas, no entanto há trabalhos que relatam a eficácia deste óleo essencial como Silva; Guerreiro (2020); Santos; Wanderley-Teixeira; *et al.* (2021); Dillmann; Cossetin; *et al.* (2020). Tendo em vista que a abelha tem grande importância econômica, social e ambiental é necessário investigar se há risco deste inseticida botânico sobre elas. Os testes em vertebrados são tão importantes quanto em abelhas, pois pode haver

o risco de causar algum efeito sobre o desenvolvimento como malformações e a morte. Assim testar o óleo essencial de melaleuca em embriões de *Gallus gallus domesticus* L. é importante e pode ser prospectado para os estágios iniciais de desenvolvimento dos embriões de outros vertebrados. Diante deste cenário, objetiva-se analisar a toxicidade do óleo essencial de melaleuca sobre os organismos não-alvo, operárias de *A. mellifera* e embriões de *G. gallus*, em laboratório.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agroecossistemas

Um agroecossistema é um complexo de processos ecológicos, animais, plantações, ar, solo, microrganismos, com funcionamento contínuo em um sistema modificado pelo homem. O agroecossistema pode ser um campo, uma paisagem agrícola de uma vila, região ou nação, podendo ser de qualquer tamanho com objetivo de produzir alimentos ou outros produtos agrícolas (MARTEN, 1988). Agroecossistema é definido como sistema ecológico alterado, manejado de forma a aumentar a produtividade de um determinado grupo, onde estão relacionados produtores, juntamente com consumidores (FEIDEN, 2005; DUBEY; SINGH, *et al.*, 2021).

2.2 Inseticidas botânicos nos agroecossistemas

Os inseticidas botânicos são produtos à base de plantas ou partes da mesma, que atuam de forma ativa atraindo, repelindo, inibindo o crescimento e processos de metamorfose ou até mesmo causando a morte de insetos-praga (LYNN, *et al.*, 2010; LINA, *et al.*, 2020). Inseticidas botânicos são compostos secundários produzidos pelo metabolismo das plantas. Algumas plantas utilizam desses mecanismos como defesa, as quais podem ser substâncias bioativas. Estas substâncias podem agir como repelentes aos insetos, causando intoxicações, deformidades físicas ou a morte. Essas substâncias fazem parte de alguns grupos químicos como alcaloides, terpenos, fenilpropanoides, entre outros (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015; SIENKIEWICZ *et al.*, 2011; SILVA; RAGA, 2019).

Os inseticidas botânicos são extraídos de plantas, podendo ser extratos aquosos, óleos essenciais, dentre outros. Podem ser ainda o próprio material vegetal, passado pelo processo de redução até formar pó, ou por solventes orgânicos, tais como álcool, éter, acetona, clorofórmio ou ainda pela destilação. Os

óleos essenciais são líquidos oleosos com aromas distintos, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são extraídos das flores, frutos, caule, raiz, mas, principalmente, das folhas (VAN; LEIJTEN, 1999).

Os óleos essenciais contêm propriedades bactericida, antifúngica e inseticida. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de rúcula (*Eruca sativa*), por exemplo, apresentam ação bactericida (VELOSO, 2019). Enquanto, o óleo essencial de orégano turco (*Origanum onites*), anis (*Pimpinella anisum*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), e tomilho (*Thymus vulgaris*) têm ação inseticida sobre a cochonilha-do-citros (*Planococcus citri* Hemiptera: Pseudococcidae), causando redução de oviposição e inibição da eclosão das ninfas (ERDEMIR; ERLER, 2017). Por outro lado, os óleos essenciais de arruda (*Ruta graveolens* L.) e de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) têm efeito no controle do fungo *Colletotrichum* spp. (causador de antracnose em hortaliças e frutíferas), reduzindo o diâmetro de suas colônias (PAULINO; *et al.*, 2018).

O óleo essencial pode substituir a utilização de agrotóxicos na produção agrícola, sendo considerados sustentáveis do ponto de vista da produção. Dentro deste contexto é possível encontrar vários óleos essenciais de origem botânico eficazes no controle de pragas, como por exemplo, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

2.2.1 OE de *Melaleuca alternifolia*

Melaleuca alternifolia (Linnaeus, 1767) é uma planta de origem australiana, conhecida como árvore-do-chá (*tea tree*) e pertence à família Myrtaceae, com distribuição majoritária em locais tropicais e subtropicais (BARBOSA; PAULA *et al.*, 2004). Vários estudos farmacológicos comprovam que o óleo essencial de melaleuca possui propriedades bactericida, cicatrizante, anti-infecciosa, anti-inflamatória, antisséptica, antifúngica, antiviral, imunoestimulante, febrífuga, expectorante, balsâmica, inseticida, diaforética, anticaspa, desinfetante, parasiticida, germicida e vulnerário, além de ser despigmentante e conservante natural (CORAZZA, 2004; MALUF S, 2009; CAVALARI; OLIVEIRA, 2017).

O óleo essencial de melaleuca é extraído através de suas folhas frescas que são passadas pelo processo de destilação ou hidrodestilação. Além deste método ser muito eficiente para obtenção desta substância, com custo aproximadamente entre R\$ 15 a R\$ 50 para cada 10mL. Esses líquidos extraídos das folhas, contendo alta concentração de óleo essencial, passam por testes laboratoriais, com intuito de comprovar a ação antibacteriana, germicida e anti-inflamatória (SIMÕES *et al.*, 2002).

O óleo essencial de melaleuca, em diferentes concentrações foi eficiente, no controle da lagarta-da-couve (*Ascia monuste orseis* Lepidoptera: Pieridae) (SILVA; GUERREIRO, 2020). Este óleo também é tóxico para larvas de terceiro ínstar de *Alabama argillacea* (principal praga desfolhadora do algodoeiro), além de diminuir a viabilidade dos ovos desta (SANTOS; WANDERLEY-TEIXEIRA; *et al.*, 2021). Em mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) o óleo essencial de melaleuca se demonstrou eficiente como inseticida, causando a mortalidade de até 100 % das moscas adultas (DILLMANN; COSSETIN; *et al.*, 2020).

2.3 Invertebrados e Vertebrados nos agroecossistemas

Invertebrados e vertebrados tem grande importância para os agroecossistemas, muitos destes estão associados à predação de plantas daninhas e disseminação de sementes, fazendo parte da teia alimentar e atuam no equilíbrio dos agroecossistemas (BÀRBERI *et al.*, 2010). Porém, há pouca atenção em relação aos efeitos resultantes do mau manejo em agriculturas afetando a biodiversidade animal. No entanto, verifica-se que onde há prática de cultivo orgânico (sem uso agrotóxico) e o manejo agroecológico correto, resulta em maior biodiversidade animal (BEECHER *et al.*, 2002).

Através de monitoramento por Satélite, foi utilizado meios de avaliar a biodiversidade em sistemas agrícolas, com foco na fauna de vertebrados terrestres selvagens, tanto em pequenas propriedades rurais quanto em empresas rurais modernas e intensificadas. Os resultados demonstram diferentes culturas, onde foram encontrados variados habitats nas fazendas monitorada, assim como a

diversidade vegetal supri as necessidades básicas dessas populações, tanto de alimento quanto de abrigo e até mesmo local de reprodução (MIRANDA, 2006).

Os agroecossistemas servem igualmente como corredores para inúmeros animais selvagens e até mesmo como local de pouso para várias espécies de aves migratórias, oferecendo a possibilidade de descanso e alimentação (MIRANDA, 2006). Dada à mobilidade, capacidade de dispersão e interações com outras espécies, é possível observar uma correlação de mamíferos em levantamentos de fauna. Em termos de conservação é importante porque a presença é crucial para manter o equilíbrio ecológico (MILLS, *et al.*, 1993; RODRIGUES; PRIMACK, 2001). Frutívoros e/ou herbívoros (capivara, javali e veado) desempenham um papel importante na manutenção da diversidade de árvores através da dispersão e predação de sementes, além dos carnívoros (pumas), que também ajudam a regular as populações de herbívoros e frugívoros (PARDINI *et al.*, 2006; RODRIGUES, 2019).

Além de vertebrados, os artrópodes também desempenham papel fundamental e representam cerca de 75% dos animais da Terra, dos quais 89% são insetos (BUZZI; MIYAZAKI, 1993). O desenvolvimento dos ecossistemas naturais ou manejados necessita das atividades ecológicas dos insetos, pois, desempenham papel importantíssimo como controle biológico (predadores e parasitas), manutenção da flora (polinizadores), decomposição de matéria (saprófitos), dentre outros (EHRLICH *et al.* 1980). Deste modo, a importância de proteger e conservar esses grupos de animais se faz necessário mesmo em ambientes manejados pelo homem, por exemplo, em sistemas agroflorestais (SAF), onde a utilização dos serviços ecológicos prestados por esses animais é essencial para o desenvolvimento agrícola sustentável (SOUZA *et al.*, 2018).

Nesta perspectiva e com foco em manter as populações presentes nos agroecossistemas, testes de toxicidade são realizados em invertebrados e vertebrados, sendo que usualmente os invertebrados demonstram igual ou maior sensibilidade a determinados agentes, como o efluente de gás e petróleo, quando comparado aos vertebrados (HUGHES *et al.*, 2020). Outros agentes como o glifosato, apresentam efeito tóxico tanto a invertebrados (como anelídeos, artrópodes, moluscos e equinodermos), quanto para vertebrados (peixes, répteis, anfíbios, aves e humanos). Os efeitos toxicológicos já observados foram genotoxicidade, citotoxicidade, disrupção hormonal, aberrações cromossômicas e

danos ao DNA também foram observados em vertebrados superiores, como humanos (GILL; SETHI *et al.*, 2018).

2.3.1 Importância das abelhas nos agroecossistemas

Dentre os polinizadores, destacam-se as abelhas devido seu trabalho necessário para a manutenção e biodiversidade em agroecossistemas, além disso, à facilidade de manejo, baixo custo, das mesmas (KLEIN *et al.*, 2007). As abelhas são consideradas agentes polinizadores e possuem corpo recoberto de pelos o que facilita a adesão dos grãos de pólen, quando visitam as flores. Isso melhora a polinização tornando este inseto importante polinizador (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012).

Para entender o trabalho de polinizadores é necessário compreender como funciona a polinização, onde o pólen contido na antera (parte masculina) é transferido para o estigma (parte feminina) da flor, com esta fecundação o ovário transforma-se em fruto e os óvulos em sementes (DELAPLANE; MAYER, 2000). Na natureza a polinização assegura a manutenção e a reprodução necessárias do grupo das angiospermas (OLLERTON *et al.*, 2011). O serviço de polinização das abelhas é importantíssimo para agroecossistemas (WRATTEN *et al.*, 2012), sendo que as abelhas são responsáveis pelo aumento da produtividade e qualidade dos frutos (KLEIN *et al.*, 2007). As abelhas, para poderem se alimentar e levar pólen e néctar para suas colônias, necessitam visitar as flores e assim obter a energia necessária para voar. Desta forma, as abelhas e as plantas com flores possuem interdependências (IMPERATRIZ-FONSECA; JOLY, 2017).

O valor do serviço ecossistêmico realizado pelas abelhas é incalculável em relação à manutenção da biodiversidade. Ainda há muitas espécies de abelhas para serem identificadas. Destaca-se a importância destes polinizadores em áreas agrícolas, onde são responsáveis por 80% dos serviços de polinização (KLEIN *et al.*, 2015). Entre as abelhas, a mais conhecida é *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) que, atualmente, pode ser encontrada em todos os

continentes. Há também várias espécies silvestres que têm importância na polinização (GARRAT *et al.*, 2013; GIANNINI *et al.*, 2014; KLATT *et al.*, 2014).

A canola, com suas flores atraentes de cor amarela, perfumes exalantes e alimentos em abundância, é visitada pelas abelhas, dentre elas *A. mellifera*. Apesar da canola se autopolinizar, as abelhas contribuem com aumento da produtividade e aumento do peso da semente em 18% (BOMMARCO *et al.*, 2012).

O girassol, hoje produzido em todos os continentes, tem suas sementes utilizadas, principalmente, para a extração de óleo. No Brasil, as principais visitantes das flores desta planta são as abelhas *A. mellifera* e *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Apidae) (PAIVA *et al.*, 2003). Devido a polinização das abelhas, há aumento da produtividade de sementes e melhoramento do fruto (NASCIMENTO; GOMES *et al.*, 2012).

A soja é a segunda oleaginosa de maior produção mundial, a mesma responde por 30% da produção de óleo vegetal. A variedade “BRS 133”, com tratamento, em área coberta contendo gaiolas de abelhas, teve 37,84% mais produtividade, quando comparada com os tratamentos em área coberta sem presença das abelhas (CHIARI *et al.*, 2005; WITTER *et al.*, 2014).

Apesar desses benefícios está ocorrendo a diminuição das populações de abelhas e o colapso de colônias de *A. mellifera* (PIRES, *et al.*, 2016). As ameaças estão relacionada às mudanças no uso do solo, agricultura intensiva com uso de agrotóxicos, plantas geneticamente modificadas, patógenos, mudanças climáticas globais, espécies invasoras e a interação de todos esses fatores (IMPERATRIZ-FONSECA; JOLY, 2017; SIMONE-FINSTROM; ARONSTEIN *et al.*, 2018; NATH; SINGH, 2022).

Na maior parte das vezes a causa do desaparecimento de muitos polinizadores nos agroecossistemas ocorre pelo uso excessivo e incorreto de agrotóxicos (ABATI *et al.*, 2021). Isso faz com que as colônias de abelhas que habitam matas próximas a esses locais corram risco de serem mortas, devido aos resíduos desses agrotóxicos permanecerem sobre as flores e contaminar o pólen e o néctar (NOCELLI *et al.*, 2010).

Os inseticidas imidacloprid, deltametrina e espinetoram causaram efeitos negativos em abelhas sem ferrão (*Nannotrigona* aff. *testaceicornis* Lepageletier Hymenoptera: Apidae) tanto efeitos letais quanto subletais, comparado com óleo essencial de *Lippia sidoides* Verbenaceae (pimenta de alecrim) e seus compostos

majoritários (timol, p -cimeno). Este óleo e seus compostos majoritários apresentam baixa toxicidade a estas abelhas, por outro lado as abelhas que foram tratadas com o óleo essencial de *L. sidoides* foram evitadas pelas abelhas não tratadas (MATOS; SANTOS *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* Lamiaceae), manuka (*Leptospermum scoparium* Myrtaceae), orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae), litsea (*Litsea cubeba* Lauraceae), cenoura (*Daucus carota* Apiaceae) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* Lauraceae) são eficientes no controle de *Varroa destructor* Anderson e Trueman (Acari: Varroidae) (ácaro ectoparasita de abelhas), ao mesmo tempo, demonstraram seletividade para abelhas (*A. mellifera*) em laboratório (HYBL; BOHATA *et al.*, 2021). Por outro lado, os óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer (LGRA-106 [quimiotipo timol] e LGRA-109 [quimiotipo carvacrol]) e seus compostos majoritários foram eficientes sobre *Diaphania hyalinata* Linnaeus, 1767 (Lepidoptera: Pyralidae), porém, tóxicos para *A. mellifera* (MELO; PICANCO *et al.*, 2018).

Em estudos de toxicidade é possível utilizar vários organismos como bioindicadores, montando um cenário parecido com a realidade, utilizando diversos tratamentos, a fim de analisar a seletividade destes aos organismos não-alvos. Dentro deste contexto, além das abelhas que são utilizadas, pode-se citar o teste de embriotoxicologia com vertebrados.

2.3.2 Embriotoxicologia

A embriotoxicologia é a utilização de embriões como modelo para possibilitar a investigação de diferentes agentes estressores nutricionais e ambientais no desenvolvimento embrionário. Para tal propósito, é necessário que o modelo esteja em um cenário parecido e com condições favoráveis para o desenvolvimento embrionário. Na embriotoxicologia, tem sido utilizado o embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus*) como ferramenta de pesquisa devido ao seu desenvolvimento externo, pois evita que possa sofrer influência do metabolismo materno durante o contato progenitor/embrião (MATTSON *et al.*, 2015; FLENTKE; SMITH, 2018;

KUBIAK *et al.*, 2021). Além do mais, o desenvolvimento inicial do embrião de aves se assemelha ao dos humanos (MOORE; PERSAUD, 2008).

A utilização de embrião de ave é uma ferramenta importante para teste toxicológico, pois permite investigar possíveis efeitos causados por substâncias químicas ou agentes estranhos sobre o desenvolvimento embrionário. Dependendo dos estágios avaliados esses efeitos podem ser extrapolados aos embriões de mamíferos (HEID *et al.*, 2001; SOUCY *et al.*, 2003; FARHAT *et al.*, 2013; SHARP; FEDOROVICH, 2015). O ovo de galinha é do tipo megalécito não depende do organismo materno para o desenvolvimento embrionário e contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, exceto o oxigênio que entra através de pequenos poros contidos na membrana envoltória (casca), a qual é resistente. O vitelo, também conhecido como gema, possui lipídeos e proteínas envoltos por uma fina camada denominada de membrana vitelina, que formará o saco vitelínico próximo do embrião em formação.

Trabalhos realizados relatam que para ter o efeito realista deve-se injetar agentes de interesse diretamente na gema antes de iniciar incubação (POWELL *et al.*, 1996; HENSHEL *et al.*, 1997; BURGGREN *et al.*, 2016) o qual, ainda é discutido. O desenvolvimento do embrião de *G. gallus* é de curto prazo, com apenas 21 dias, o embrião fica localizado na parte superior do ovo, facilitando o acompanhamento do desenvolvimento embrionário em laboratório (SCHOENWOLF, 1999) e, seu desenvolvimento é bem documentado. Assim, o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário nos permite acompanhar a organização estrutural básica do embrião (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

As fases de clivagem e blástula correspondem ao desenvolvimento embrionário procedendo da postura da ave. Neste instante, o embrião encontra-se no estágio de blastoderma (estrutura discoidal), constituída por duas camadas: o epiblasto e o hipoblasto (GILBERT, 2001).

Para que a embriogênese prossiga em um experimento ou em ambiente natural, é necessário que tenha condições que favoreça a expressão gênica e fenotípica do programa de morfogênese e organogênese estabelecidos para a espécie (WOLPERT, 2000). Para que ocorra o desenvolvimento do embrião de *Gallus gallus*, até o momento da eclosão, é necessário que o ambiente mantenha a temperatura em 38° C, com umidade e oxigenação relativa do ar apropriadas. Além

disso, os ovos férteis de *G. gallus* são de fácil acesso, pois há comercialização dos mesmos e com baixo custo (GONZALES, 1994; DIAS, 1996).

Os estádios são classificados conforme o desenvolvimento de estruturas do embrião (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Com base nesses estádios é possível acompanhar as modificações embrionárias que relacionam ao correto desenvolvimento com base no tempo de vida. Várias substâncias podem causar alterações na embriogênese, promovendo anomalias quando comparados ao padrão normal da espécie (NARBAITZ, 1985; ANWER *et al.*, 1988; VODELA *et al.*, 1997; DIAS; MÜLLER, 1999; CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003; TALUKDAR; LANGTHASA *et al.*, 2020; ABBAS; IQBAL *et al.*, 2020). Para analisar a possível teratogenicidade de agentes químicos, biológicos ou botânicos, pode se observar as anormalidades entre os embriões. Estes agentes também podem interferir no crescimento sendo possível analisar nas medidas do embrião, peso dos órgãos ou saco vitelínico (MAYER *et al.*, 1992). A mortalidade é considerada o último biomarcador relacionado aos efeitos tóxicos, quando um agente resulta em ação letal sobre o embrião (CHO; LEE, 1990; HEINRICH-HIRSCH *et al.*, 1990).

O óleo essencial de cravo da Índia *Syzygium aromaticum* Myrtaceae quando utilizado na sanitização de ovos, não afetou o desempenho do frango de corte (*Gallus gallus*) nem influenciou na janela de eclosão e qualidade de embriões de pintos de até um dia de idade (OLIVEIRA; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Por outro lado, o óleo essencial de *Thymus schimperi* Lamiaceae, em altas doses, afetou negativamente o desenvolvimento de embriões e fetos de ratos (*Rattus norvegicus*) (ADANE; ASRES *et al.*, 2022).

I TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE) A *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) apresentam papel crucial nos agroecossistemas, pois realizam o forrageamento e, ao entrar em contato com o néctar e o pólen das flores, fazem o serviço de polinização nas plantas visitadas (SILVA; RADAESKI *et al.*, 2020). As abelhas contribuem com mais de 70% na polinização das espécies vegetais, promovendo a manutenção e preservação da biodiversidade vegetal e animal (CALDERONE, 2012; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012).

Compreender as interações que ocorrem entre os polinizadores e as plantas, determina o sucesso da polinização e as contribuições para reprodução das plantas de diferentes culturas (HUNG *et al.*, 2018; WITTER, 2014). As abelhas têm importância econômica, fazendo manutenção da biodiversidade liderando o ranking dos polinizadores e agregando maior valor, aumentando a produtividade e melhorando a qualidade de frutos (SIEBERT *et al.*, 2020; SOARES; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Além disso, no Brasil, há muitas plantas que dependem, principalmente, da polinização das abelhas para se reproduzir como castanha-do-brasil, caju, maçã, maracujá, melão, melancia e pinhas (EMBRAPA, 2019). A ausência dos polinizadores afeta não só o ecossistema, mas também influencia diretamente a produção agrícola (POTTS *et al.*, 2010).

Os principais produtos produzidos pelas abelhas, além da polinização são o mel, geleia real, própolis, cera, pólen, apitoxina (EMBRAPA, 2007; MORITZ; ERLER, 2016; ULLAH; GAJGER *et al.*, 2021). Elas são encontradas em várias regiões do mundo e estão, constantemente, expostas a diversas pressões dependendo do ambiente, podendo adaptar-se a mudanças de clima e diferentes nichos (SILVA, 2014; ABEMEL, 2015; CHAPMAN *et al.*, 2019; MONTERO-MENDIETA; TAN *et al.*, 2019; BARBOSA, 2015; CALDERONE, 2012; SOUZA *et al.*, 2007; SILVA, 2014).

O uso excessivo ou incorreto dos agrotóxicos a fim de controlar insetos praga, pode ocasionar a resistência (ISMAN, 2000), e também podem ser prejudiciais para as abelhas (RAYMANN *et al.* 2018; OSTIGUY *et al.*, 2019; BIRD *et al.*, 2021). Portanto, procura-se meios alternativos naturais para controle de insetos-praga, que apresentem menor agressão para as abelhas e sejam tão eficientes quanto os agrotóxicos (ZANDI-SOHANI; RAMEZANI, 2015).

Como meios alternativos naturais, os inseticidas botânicos são estudados e vem sendo utilizados, apresentando várias formas de atividades biológicas, sendo de forma isolada ou em substâncias compostas (ISMAN, 2006; BRAIMAH; MOCHIAH *et al.*, 2014; ISMAN, 2020). Dentre os inseticidas botânicos, o óleo essencial é o mais estudado e é extraído de plantas. Estes óleos contêm substâncias complexas ativas, que agem como inseticida (HADDI *et al.*, 2020; CAETANO; CARDOSO *et al.*, 2022). Estratégias desenvolvidas utilizando o óleo essencial podem induzir a redução da utilização de agrotóxicos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais podem atuar, controlando insetos-praga. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* L. (Myrtaceae) é utilizado para controlar microrganismos e é um inseticida botânico natural (CAVALARI; OLIVEIRA, 2017; BATTISTI; CAON *et al.*, 2021). Este óleo causa bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial de *Tribolium confusum*, provocando sua morte (LIAO; YANG *et al.*, 2018). Também, quando testado em nanopartículas sobre cupins (*Coptotermes gestroi* Wasmann Isoptera: Rhinotermitidae) provoca repelência e mortalidade (CLERIC; SOUZA *et al.*, 2018).

O óleo essencial de *Corymbia citriodora* Myrtaceae apresenta potencial inseticida sobre *Ascia monuste* Latreille (Lepidoptera: Pieridae). Entretanto foi seletivo para a formiga predadora *Solenopsis saevissima* F. Smith (Hymenoptera: Formicidae), e tóxico para a abelha *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera: Apidae) (RIBEIRO; FARIAS *et al.*, 2018). Com base na especificidade de cada inseticida botânico, em especial dos óleos essenciais, e também dos organismos não-alvo, o presente trabalho objetivou analisar a toxicidade do óleo essencial de *M. melaleuca* em *A. mellifera*, em diferentes métodos de exposição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* de Dois Vizinhos (UTFPR-DV), no Laboratório de Controle Biológico (LABCON) e na Unidade de Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE-Apicultura). Para a obtenção de abelhas foram utilizados favos contendo crias operculadas de *A. mellifera* africanizada, com 19 dias. Os favos foram retirados do apiário da UTFPR-DV e armazenados em sacos de papel Kraft, lacrados, perfurados e transportados até o laboratório de Controle Biológico I e então foram alocados em câmara climatizada entre (30 ± 2 ° C, U.R. de 60 ± 10 %), até a emergência das operárias, com isso foram obtidas abelhas com idade padronizada.

O óleo essencial de melaleuca foi fornecido pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a preparação das soluções foi utilizada a concentração de 0,75 %, a solução foi preparada em solução de Tween 80[®] a 0,01 %. Foram utilizadas diferentes metodologias de tratamento, por pulverização direta, pulverização indireta e Alimentação (Tabela 1).

Para o contato das operárias com os tratamentos de forma, indireta (pulverização sobre as placas de petri), direta (pulverização sobre as abelhas foi pulverizado 290 µL dos tratamentos (baseado no volume utilizado por hectare em relação com a área da placa). Para a pulverização dos tratamentos, foi utilizado um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] interligado a uma bomba Tecnal[®] (TE-058) de pressão constante ($1,2 \text{ kgf.cm}^{-1}$).

Tablela 2 - Método de exposição, tratamentos e soluções, para a análise de toxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* a operárias de *Apis mellifera* africanizada.

Exposição	Tratamentos	Soluções	Abel. / trat.
Pulv. Indireta	T1 Controle	290 µL Água destilada	50
	T2 Controle positivo	290 µL Fipronil 13,07µL/mL (10 ppm)	50
	T3 OE Melaleuca	290 µL do OE Melaleuca (0,75 %) + Tween 80® (0,01 %)	50
Pulverização Direta	T1 Controle	290 µL Água destilada	50
	T2 Controle positivo	290 µL Fipronil 13,07µL/mL (10 ppm) em água destilada	50
	T3 OE Melaleuca	290 µL do OE Melaleuca 0,75 % em Tween 80® a 0,01 % água destilada	50
Alimentação	T1 Controle	50% água destilada 50 % açúcar	50
	T2 Controle positivo	Fipronil 13,07µL/mL (10 ppm) com açúcar e água	50
	T3 OE Melaleuca	OE Melaleuca 0,75 % em Tween 80® a 0,01 % água destilada 50% açúcar	50

Fonte: Autoria própria (2022)

2.1 Pulverização indireta do óleo essencial de melaleuca sobre operárias de *A. mellifera*

Com o aerógrafo, foram pulverizados os tratamentos nas placas de Petri (15 cm Ø × 1,5 cm de altura) (Figura 1A) com 290 µL. As placas foram acondicionadas na câmara de fluxo laminar horizontal para a evaporação completa da água (LIBARDONI *et al.*, 2021). Na sequência, 10 operárias de *A. mellifera* foram anestesiadas com CO₂, por até 120 segundos, e alocadas no interior dessas placas (Figura 1 B), onde ficaram por duas horas, sendo uma placa de cada tratamento considerada uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento.

Figura 1- Tratamentos de pulverização indireta: (A) Pulverização dos tratamentos dentro da placa de petri esterilizada; (B) Abelhas anestesiadas com CO₂ sendo alocadas dentro das placas de petri já contendo o tratamento.



Fonte: Aatoria própria (2022)

Depois das 2 horas de contato foi realizada a transferência das abelhas, de cada placa para uma gaiola de PVC (20 cm de altura × cm de Ø), correspondente. Dentro de uma das extremidades das gaiolas foi adicionado um recipiente, com tela antiáfídica na borda, contendo água destilada esterilizada com açúcar (Figura 2 A). Estas gaiolas foram fechadas de um lado da extremidade com tela antiáfídica e do outro com voal em seguida as gaiolas foram alocadas horizontalmente sobre prateleiras (Figura 2B). Cada gaiola passou a ser considerada uma repetição (COLOMBO, 2019)

Figura 2- (A) Gaiolas de PVC contendo *A. mellifera* já tratadas e com alimento dispostas em sala de criação. (B) Recipiente de plástico com tela antiáfídica na borda com alimento para *A. mellifera*.



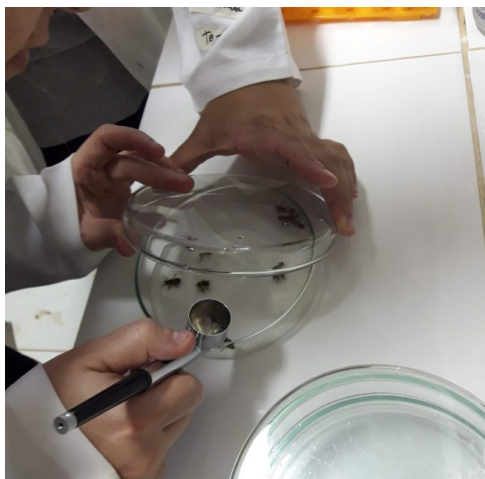
Fonte: Aatoria própria (2022)

As gaiolas com as operárias foram acondicionadas em sala climatizada com temperatura e umidade controladas (27 ± 2 ° C, U.R. de 60 ± 10 %). A mortalidade das operárias foi avaliada a partir de duas, quatro, seis, 12, 24, 36, 48, 96, 120 até 168 horas após o contato com os tratamentos, realizando a contagem das abelhas mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhuma reação ao serem tocadas com uma pinça.

2.2 Pulverização direta de óleo essencial de melaleuca sobre operárias de *A. mellifera*

Foram anestesiadas 10 operárias de *A. mellifera*, com CO₂, por até 120 segundos e inseridas no interior de placas de Petri (15 cm Ø×1,5 cm de altura) esterilizada. Com a utilização de um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®], interligado a uma bomba Tecnal[®] (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm), foi pulverizado 290 µL do óleo essencial de melaleuca (calculado conforme a quantidade utilizada por hectares) diretamente sobre as operárias alocadas nas placas de Petri[®] (Figura 3). O delineamento experimental constou de cinco placas contendo 10 abelhas em cada tratamento, totalizando cinco repetições por tratamento. Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no item 3.1.

Figura 3- Pulverização direta do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Apis mellifera*.



Fonte: Autoria própria (2022)

2.3 Toxicidade, por alimentação, do óleo essencial de melaleuca sobre *Apis mellifera*

O alimento a ser fornecido foi preparado individualmente, para cada tratamento. Foi realizada uma mistura de 50 g de açúcar de confeitiro + 50 mL de água destilada ou 50 mL da solução do tratamento. Como testemunha foi utilizado água destilada e açúcar (sem adição dos tratamentos). A distribuição das repetições e tratamentos, bem como as condições experimentais e os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos no item 3.1.

Foram colocadas 10 operárias de *A. mellifera*, anestesiadas com CO₂, em gaiolas de PVC (20 cm de altura x cm de Ø). Dentro de um recipiente com capacidade de 10 mL, foi fornecido uma porção de água com açúcar com incorporação dos tratamentos, e alocado dentro de uma das extremidades da gaiola de PVC. A gaiola foi fechada em uma das extremidades com tela antiáfídica e na outra extremidade com voal.

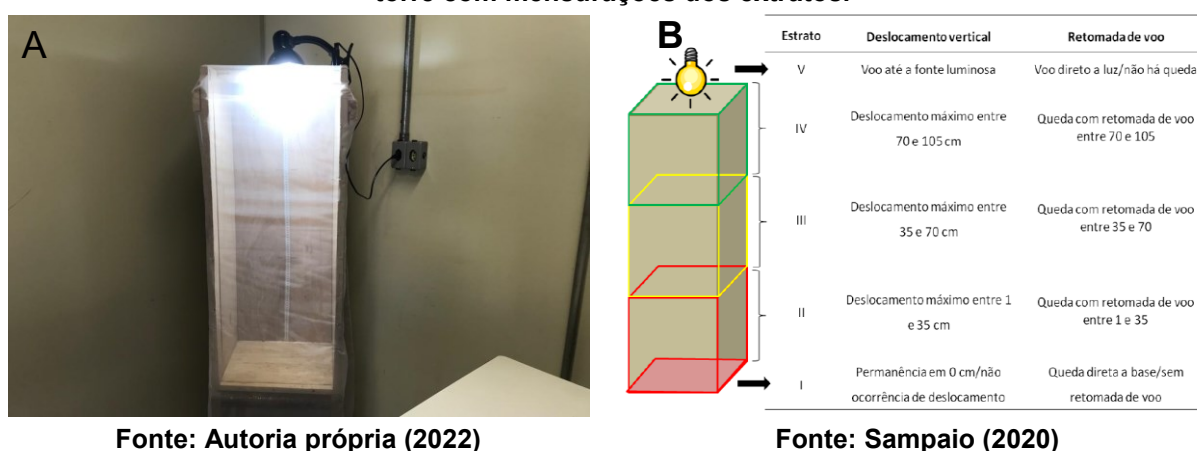
A cada avaliação o alimento foi verificado caso a quantidade estivesse reduzida de forma que as abelhas não conseguissem alcançar o alimento com a probóscide sobre a tela antiáfídica no recipiente, com uma pipeta de Pauster acrescentava-se mais alimento de forma que o alimento ficasse próximo da tela antiáfídica, com as mesmas concentrações citadas anteriormente, fazendo com que as abelhas tivessem alimento o tempo todo.

2.4 Teste de voo (deslocamento vertical) e teste de queda (retomada do voo)

Para estes testes os mesmos procedimentos descritos nos itens 2.1, 2.2 e 2.3 foram realizados. Porém para fazer o teste de voo e teste de queda as abelhas ficaram expostas a cada tratamento por 48 horas, e utilizadas as abelhas sobreviventes. De acordo com a metodologia descrita por Tomé *et al.* (2015) e Libardoni *et al.* (2021) foram utilizadas as abelhas operárias de *A. mellifera* dos experimentos realizados por contato e alimentação. O experimento foi realizado em

uma sala escura, utilizando uma torre de voo (0,35 m × 0,35 m de largura e 130 cm de altura). A estrutura da torre é feita com armação de madeira e recoberto de tecido voal, contendo uma fonte luminosa na parte superior e uma fita métrica no interior (Figura 4A). A torre de voo apresenta cinco estratos de altura (estudados): I, II, III, IV e V (Figura 4B). O estrato I indica que não ocorre o voo, ou seja, a abelha permanece na base da torre.

Figura 4- Torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo. (A) torre utilizada para teste voo e queda, (B) modelo de torre com mensurações dos estratos.



Fonte: Autoria própria (2022)

Fonte: Sampaio (2020)

Para avaliar o voo das abelhas após a exposição aos tratamentos do OE de Melaleuca, dez das abelhas sobreviventes de cada tratamento foram soltas, uma por vez, avaliando o deslocamento por um minuto com um toque para que a abelha se movimentasse, marcando o estrato máximo atingido. Posteriormente as abelhas utilizadas foram descartadas, para o teste de queda (retomada de voo) as abelhas foram liberadas na base superior da torre e analisada a altura em que a abelha conseguiu retomar o voo para a fonte luminosa.

2.5 Análise estatística

Para avaliar a longevidades das abelhas *A. mellifera* através de análise estatística foi utilizado o modelo de riscos de noções básicas proporcionais de Cox, sendo uma regressão linear múltipla (R CORE TEAM, 2021). Os tratamentos foram

comparados usando o teste de log-rank e a análise completa foi realizada utilizando o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do software R (R CORE TEAM, 2021). Pelo fato das abelhas terem sido agrupadas em gaiolas houve a possibilidade de algum efeito da gaiola na mortalidade das abelhas, então foram utilizados dois modelos um misto (efeito aleatório de efeito de gaiola) e outro fixo (não inclui efeito de gaiola) comparados através de teste de razão de verossimilhanças. Após a escolha do modelo foi utilizado o teste de Tukey para queda e voo.

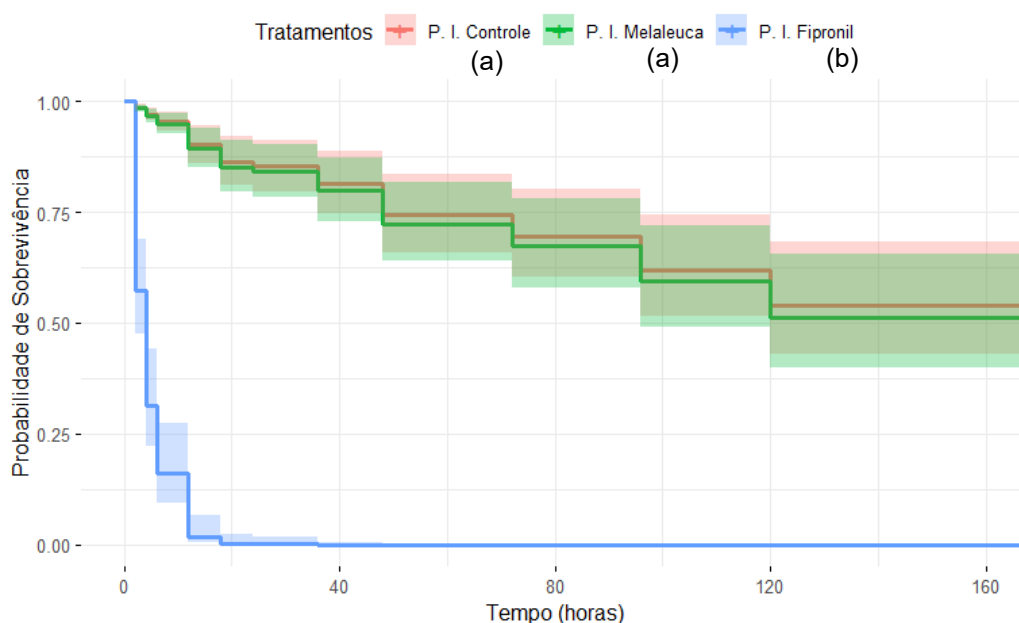
Nos testes de Retomada de voo e deslocamento vertical (queda) os dados obtidos têm-se uma variável qualitativa ordinal, ou seja, que há algum tipo de ordem nos resultados obtidos, onde aborda modelo específico denominados de Modelos Logísticos Acumulativos para respostas ordinais (AGRESTI, 1996). O modelo foi ajustado pela verossimilhança, em seguida aplicado a análise de qui quadrado (R CORE TEAM, 2021).

3 RESULTADOS

3.1 Pulverização indireta, direta e alimentação de operárias de *A. mellifera* com óleo essencial de melaleuca

O óleo essencial de melaleuca não causou redução na probabilidade de sobrevivência de operárias de *A. mellifera*, quando comparado ao controle. Por outro lado, o controle positivo, composto por Fipronil, reduziu a probabilidade de sobrevivência destas abelhas, nas primeiras 24 horas (Figura 5), diferindo significativamente dos demais tratamentos.

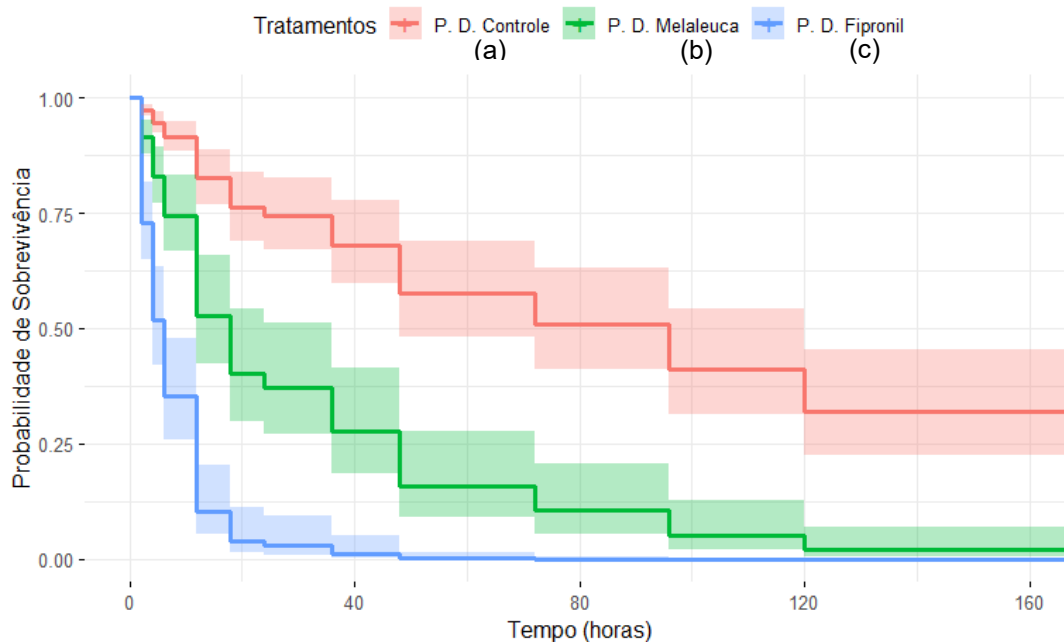
Figura 5- Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* africanizada após pulverização indireta dos tratamentos.



Fonte: Autoria própria (2022)

O óleo essencial de melaleuca, quando pulverizado diretamente sobre operárias de *A. mellifera*, provocou redução na probabilidade de sobrevivência destas, comparado às abelhas do grupo controle. Apesar desta redução na sobrevivência, diferiu do controle positivo (Fipronil), o qual provocou redução ainda maior, diferindo significativamente tanto do controle quanto do óleo essencial de melaleuca (Figura 6).

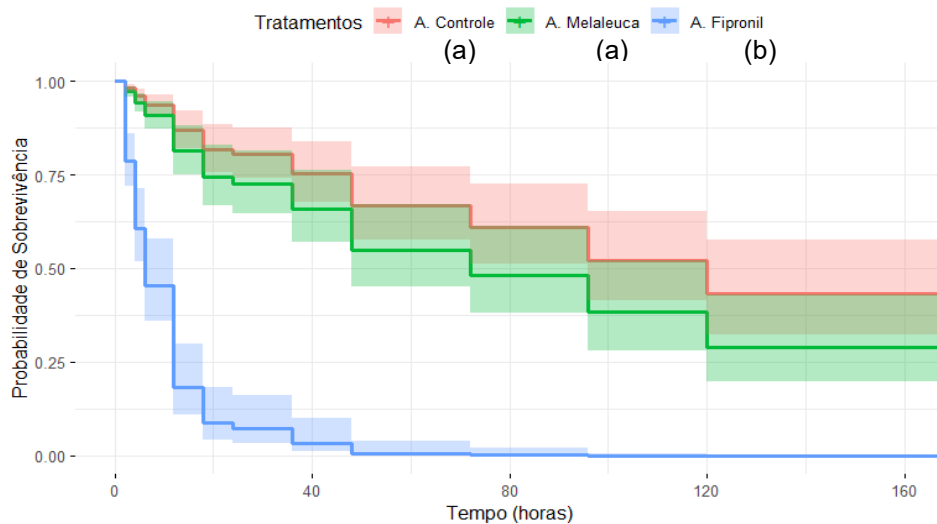
Figura 6- Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* africanizada após pulverização direta dos tratamentos.



Fonte: Autoria própria (2022)

Quando as abelhas ingeriram dieta contendo o óleo essencial de melaleuca este não interferiu na probabilidade de sobrevivência, ao contrário do observado quando as abelhas ingeriram a dieta contendo Fipronil. Este inseticida causa rápida redução na probabilidade de sobrevivência deste inseto (Figura 7).

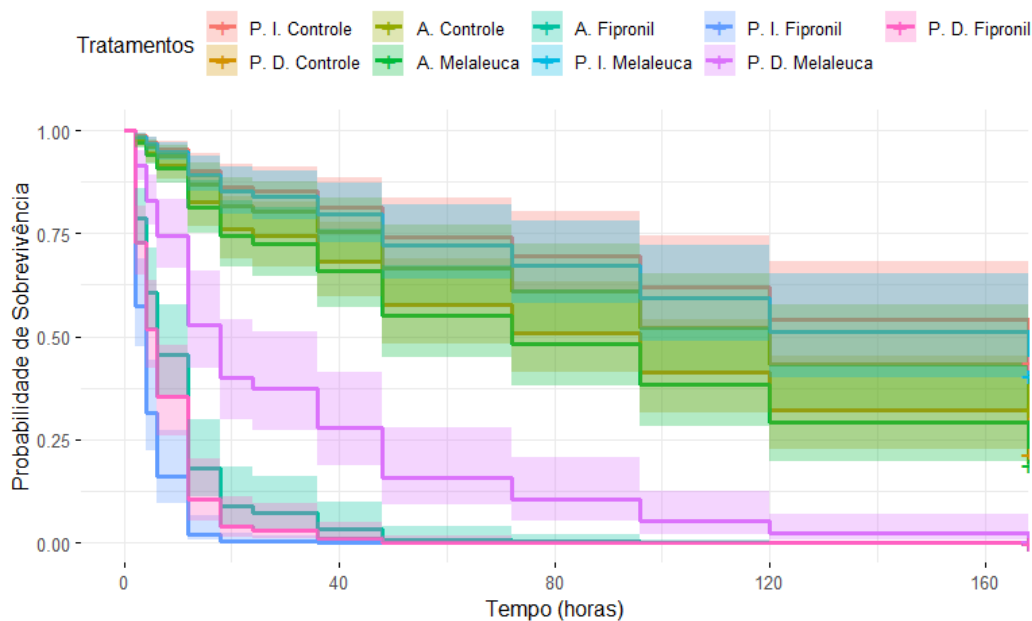
Figura 7- Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* africanizada após ingestão dos tratamentos.



Fonte: Autoria própria (2022)

O inseticida Fipronil interferiu na probabilidade de sobrevivência das operárias de *A. mellifera* africanizada em todos os métodos de exposição. O óleo essencial de melaleuca, por outro lado, interferiu na probabilidade de sobrevivência de *A. mellifera* apenas no método de pulverização direta sobre estas (Figura 8).

Figura 8: Probabilidade de sobrevivência das operárias de *Apis mellifera* após serem submetidos aos tratamentos em diferentes exposições.



Fonte: Autoria própria (2022)

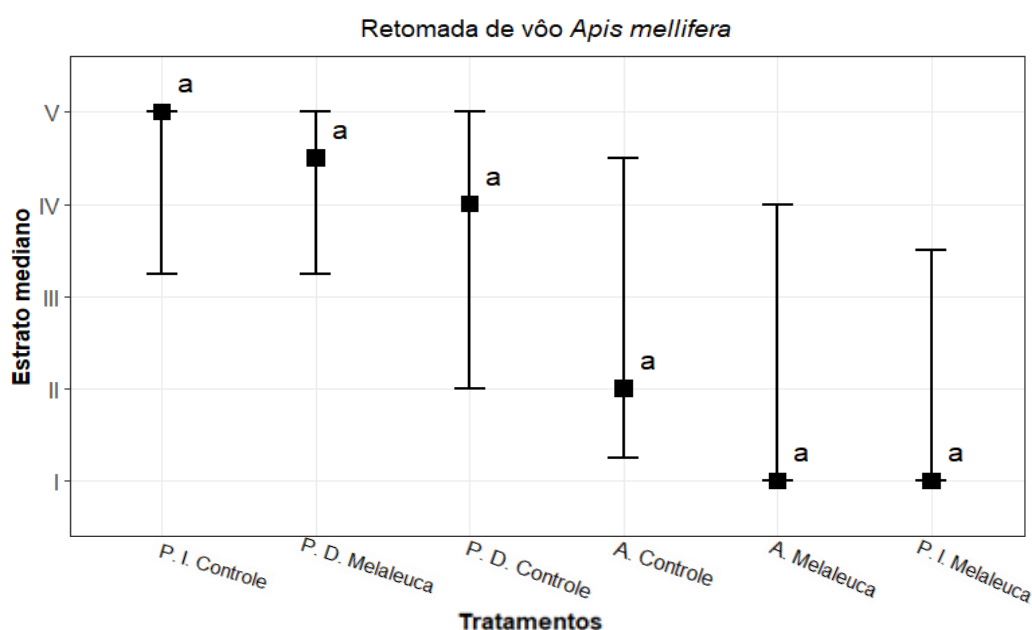
3.2 Teste de deslocamento vertical (Voo) e Retomada de Voo (queda)

Não foi possível utilizar os testes de deslocamento vertical e retomada de voo para as abelhas expostas ao Fipronil, pois em 24 horas, já não havia abelhas vivas. Por outro lado, as abelhas expostas ao óleo essencial de melaleuca continuaram vivas. Estas abelhas, quando em contato com o óleo essencial de melaleuca não tiveram a retomada de voo comprometida (Figura 9).

As abelhas do grupo controle que foram submetidas ao teste retomada de voo oriundas da metodologia de pulverização indireta retomaram o voo no estrato V (voo direto a luz/não há queda Figura 4), as abelhas que foram submetidas a ingestão e as abelhas expostas a pulverização indireta de melaleuca tiveram a retomada de voo no estrato I (queda direto a base, sem retomada de voo Figura 4), as abelhas do controle oriundas do grupo pulverização direta, em média, retomaram

o voo no estrato IV (entre 70 e 105 cm). As abelhas oriundas do grupo da pulverização direta do óleo essencial de melaleuca retomaram o voo entre os estratos IV e V (entre 70 e 105 cm, e voo direto a luz Figura 4). As abelhas do grupo controle na alimentação retomaram o voo no estrato II (entre 1 e 35 cm). Já as abelhas que foram submetidas à alimentação com melaleuca tiveram a retomada de voo no estrato I (queda direto a base, sem retomada de voo Figura 4).

Figura 9- Retomada de voo de *Apis mellifera* africanizada após tratamentos, comparações múltiplas de verossimilhança e qui-quadrado.

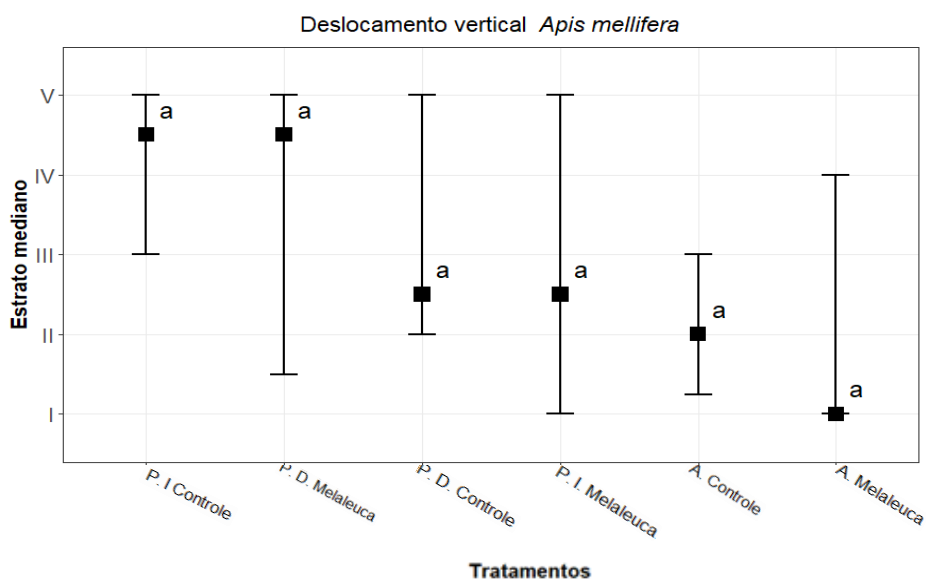


Fonte: Autoria própria (2022)

No teste de deslocamento vertical as abelhas do controle, oriundas da metodologia pulverização indireta deslocaram-se entre os estratos IV e V (até a fonte luminosa e entre 70 e 105 cm), as abelhas tratadas com óleo essencial de melaleuca com o método de pulverização indireta deslocaram-se entre os estratos III e IV (entre 35 e 70 e entre 70 e 105 cm), as abelhas do controle oriundas de pulverização direta deslocaram-se entre os estratos III e IV, as abelhas tratadas com óleo essencial de melaleuca, oriundas da metodologia de pulverização direta deslocaram-se entre os estratos IV e V. Já as abelhas do controle alimentação em média deslocaram no estrato III (entre 35 e 70 cm) e as abelhas tratadas com óleo essencial de melaleuca na alimentação deslocaram-se ao estrato I (0 cm/não ocorreu o deslocamento). As

abelhas expostas ao óleo essencial de melaleuca não apresentaram alteração no deslocamento vertical (Figura 10).

Figura 10- Deslocamento vertical de *Apis mellifera* africanizada após tratamentos, comparações múltiplas de verossimilhança e qui quadrado.



4 DISCUSSÃO

As abelhas ao realizarem o processo de forrageamento coletam o pólen, néctar e resina, o que faz com que visitem diversas flores por dia, a fim de suprir suas necessidades e da colônia (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012). No entanto, o mesmo ambiente que fornece alimento, pode prejudicar estes polinizadores. Pois os produtos contaminantes, estando sobre as plantas acabam por contaminar seu alimento e, conseqüentemente, prejudicam o desenvolvimento das abelhas operárias (TOMÉ *et al.*, 2020).

Estas abelhas podem ser contaminadas devido à ação sistêmica desses inseticidas, que são translocados para o pólen e para o néctar, principal alimento desses organismos (ABATI *et al.*, 2021; BALBUENA *et al.*, 2015). Além disso, o contato direto desses insetos durante a pulverização das culturas, aliado à persistência desses produtos no ambiente, contribui para a contaminação desses animais pelo contato com resíduos em exsudatos vegetais, solo e água.

Nesse sentido, em laboratório, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, através dos métodos de pulverização e no alimento não influenciou na probabilidade de sobrevivência de operárias de *A. mellifera*, assim sendo, este óleo age de forma seletiva para as abelhas. A forma seletiva de inseticida pode ocorrer de duas formas: fisiológica e ecológica. A seletividade fisiológica é a utilização de um inseticida com potencial mais tóxico para a praga do que para seus inimigos naturais ou polinizadores, ou seja, os inimigos naturais ou polinizadores são mais tolerantes ao ingrediente ativo do que a praga (EMBRAPA ALGODÃO, 2008; GODOY *et al.*, 2010; O'BRIEN, 1960). Já a seletividade ecológica procura técnicas de utilizar inseticidas, de forma que diminua a exposição do inimigo natural e/ou polinizadores, como a abelha, ao inseticida/agente de controle (ALIX *et al.*, 2001; EMBRAPA ALGODÃO, 2008; FREYMUELLER *et al.*, 2019; RIPPER *et al.*, 1951). Esta seletividade ecológica normalmente é possível por meio de aplicações com base no horário do dia. Neste caso aplica-se o inseticida/agente de controle na hora em que há menor presença de inimigos naturais ou polinizadores (MACIEL; BARBOSA; PREZOTO, 2022).

Alguns óleos essenciais da família Myrtaceae, mesma família da melaleuca, mostraram-se promissores para o controle de insetos-praga (EBADOLLAHI; SENDI, 2015; LOBO *et al.*, 2019; PAVELA, 2015; REGNAULT-ROGER, 2012; STENGER *et al.*, 2021), em contrapartida, com baixa persistência e baixa toxicidade a organismos não-alvo (PAVELA; BENELLI, 2016). Além disso, em doses reduzidas são eficientes em comparação aos produtos químicos (IZADI *et al.*, 2012; ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

Comparando a metodologia de pulverização direta e alimentação, a pulverização direta interferiu na probabilidade de sobrevivência das abelhas. Portanto, o óleo essencial de melaleuca pode ter causado repelência às abelhas *A. mellifera*, quando presente no alimento. O interesse de inseticidas botânicos como recurso natural tem sido estudado para detectar seu potencial ativo, podendo agir na forma de inseticida e/ou repelente aos insetos (ISMAN, 2016).

Esse potencial de repelência também foi observado em *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) quando testado o óleo essencial de *Myrtus communis* (Myrtaceae) na alimentação (YAGHOBI-ERSHADI *et al.*, 2006). Da mesma forma, em *Callosobruchus macullatus* (Coleoptera: Bruchidae) o óleo essencial de *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) além de causar repelência também agiu como inseticida via fumigação (ZANDI-SOHANI *et al.*, 2013). O óleo de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) repele larvas e reduz a oviposição de *Diaphania hyalinata* (L., 1758) (Lepidoptera: Crambidae) (Lobo *et al.*, 2019).

O óleo essencial de *E. uniflora* (mesma família da melaleuca), utilizada na concentração de 0,75 %, causou toxicidade para o inimigo natural *Cleruchoidea noackae*, da ordem Hymenoptera, mesma ordem das abelhas *A. mellifera*, ocasionando redução no potencial de parasitismo de ovos, além de reduzir a porcentagem de emergência dos adultos (STENGER *et al.*, 2021). Por outro lado, no presente trabalho, este mesmo óleo, utilizado na mesma concentração não foi tóxico a *A. mellifera* quando em contato indireto ou presente na alimentação.

A pulverização direta do óleo essencial interferiu na sobrevivência de operárias de *A. mellifera*. Este óleo de melaleuca pode ter inibido as enzimas desintoxicantes, provocando a mortalidade das abelhas. Este efeito pode estar ligado ao comportamento de autolimpeza realizado pelas abelhas, as quais utilizam as pernas para limpar as antenas, olhos, glossa, mandíbula e asas (COUTO; COUTO, 2002). Durante tal comportamento as abelhas podem levar o óleo essencial

de melaleuca em contato com a glossa acabando por ingerir esse óleo e se intoxicar. Esse efeito (inibido as enzimas desintoxicantes) já é observado em estudos, onde apontam que está relacionado à monoterpenoides e sesquiterpenoides de óleos essenciais de plantas. Estes monoterpenoides e sesquiterpenoides, agem inibindo a atividade da enzima acetilcolinaesterase, como consequência de neurotoxicidade ou interação com um ou mais receptores no sistema nervoso do organismo (ISMAN; TAK, 2017).

O óleo essencial de *M. alternifolia* contém os constituintes majoritários terpinen-4-ol (41,34%), γ -terpineno (19,19%) e α -terpineno (9,12%) (ZIMMERMANN; *et al.*, 2021; SHELTON; *et al.*, 2002). Encontra-se compostos lipofílicos, isto é, terpenos (mono e sesquiterpenos), os quais causam alterações fisiológicas e comportamentais nos insetos, onde reduziu a taxa de crescimento, aumentou o número de dias no desenvolvimento da fase pupa, diminuiu a reprodução, inibiu o consumo de alimentos (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Abelhas *A. mellifera*, quando alimentadas com xarope de sacarose, contendo óleo de tomilho *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), apresentaram resultado positivo de gene-chave de RNA. *argonaute-2* e *dicer-like*, genes que expressam peptídeos antimicrobianos, indicativo de saúde das abelhas (PAREKH; DAUGHENBAUGH; FLENNIKEN, 2021). O óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae), adicionado na alimentação de *A. mellifera*, demonstrou seletividade para esta abelha, mesmo sendo inseticida para diversos insetos (PINHEIRO; LUZ *et al.*, 2019).

Ninfas de 5º ínstar de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Asopinae), após ingestão de *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) tratada com o óleo essencial de melaleuca, apresentou alongamento das células digestivas e, depois de 48 horas, apresentaram lise celular com liberação do material no lúmen (BRAGA; CRUZ *et al.*, 2020). Este fato pode ter ocorrido durante a autolimpeza das abelhas tratadas com óleo essencial de melaleuca pulverizada diretamente, alterando as células digestivas e afetando a sobrevivência das mesmas.

Em *Pediculus humanus* L. (Phthiraptera: Pediculidae) o óleo essencial de melaleuca foi efetivo, agindo na inibição de acetilcolinesterase (MILLS *et al.*, 2010). O composto majoritário terpinen-4-ol do óleo essencial de melaleuca é eficiente no controle de *Sitophilus zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae), a mesma inibiu a atividade de três enzimas, glutathione S-transferase, carboxilesterase (enzimas

desintoxicantes) e acetilcolinesterase (enzima de condução nervosa), impedindo o transporte de hidrogênio e interferindo na síntese de energia na cadeia respiratória (LIAO *et al.*, 2016). O óleo essencial de melaleuca tem sua propriedade inseticida comprovada sobre vários insetos quando pulverizado diretamente sobre estes (BRAGA; CRUZ *et al.*, 2020).

O voo é indispensável para as abelhas, é através dele que as operárias coletam alimento para sua sobrevivência (WITTER *et al.*, 2014; BAIRD; TICHIT; GUIRAUD, 2020). Durante a coleta de alimento, as abelhas podem entrar em contato com diversas plantas contaminadas, mesmo que não causem a morte imediata, podem afetar a capacidade de orientação e, conseqüentemente, o voo (BAIRD; TICHIT; GUIRAUD, 2020; LIBARDONI *et al.*, 2021; WITTER *et al.*, 2014). As abelhas tratadas com óleo essencial de melaleuca, no presente trabalho, em diferentes metodologias de exposições, na análise múltipla, não tiveram o voo afetado.

Nesse sentido, as abelhas quando expostas a inseticidas podem ter a capacidade de voo afetada, interferindo nas atividades da colônia, como ocorre quando entram em contato com os neonicotinoides (imidacloprid, deltametrina e semissintéticos: espinetoram). Estes foram testados em abelhas sem ferrão *Nannotrigona aff. testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae) e reduziram a capacidade de locomoção e orientação de voo (MATOS *et al.*, 2021). No entanto, alguns inseticidas botânicos, comparados com o inseticida sintético, causam menor efeito sobre os insetos, é o caso do óleo essencial de melaleuca comparado com o Fipronil testado no presente trabalho.

Portanto, antes da aplicação de qualquer produto em áreas agrícolas deve-se levar em conta fatores que podem interferir no modo de ação dos produtos. Entre os fatores destaca-se temperatura, umidade e concentração do produto. Isto reflete na concentração, dose em que as abelhas entraram em contato e os efeitos causados nestas. Para evitar a contaminação das abelhas com estes produtos é necessário observar as épocas e horários menos visitados pelas abelhas nestas áreas (VILLA; VIGHI *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2020). Outro fator importante é seguir as orientações de aplicações de substâncias com tempo residual diminuído, nestes casos as pulverizações devem ser baseadas no tempo residual para que isso não venha a afetar as abelhas (JOHANSEN E MAYER, 1990; PINHEIRO; FREITAS, 2010). Entretanto, não há estas informações para inseticidas botânicos, como o óleo

essencial de melaleuca. Sendo este um campo que deve ser pesquisado para determinar a melhor época/período de pulverização deste.

Recomenda-se a aplicação realizada ao entardecer para evitar o período de maior atividade polinizadora (JUNG *et al.*, 2020). Além disso, os óleos essenciais possuem vantagens como: baixa persistência no ambiente devido à sua rápida degradação (REGNAULT-ROGER, 2012), o que também contribui para sua seletividade (MORENO *et al.*, 2012).

Ao utilizar a metodologia de aplicar o inseticida botânico, como o óleo essencial de melaleuca em horário de menor atividade dos polinizadores, reduz-se a probabilidade de contato direto das abelhas com este produto. Destacando que a pulverização direta deste óleo sobre *A. mellifera* é a metodologia que mais reduziu a probabilidade de sobrevivência dessas abelhas. O óleo essencial de melaleuca pode ser usado positivamente devido ao seu potencial como inseticida botânico para controlar insetos-praga, e por ser seletivo a *A. mellifera*, tanto na pulverização indireta quanto na metodologia de alimentação. A importância do óleo essencial de melaleuca ser seletivo às abelhas é devido ao papel em que estas desempenham na polinização, aumentando a produtividade agrícola e causando a manutenção dos agroecossistemas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* não causou toxicidade a *A. mellifera* na metodologia de pulverização indireta e de alimentação. Por outro lado, este óleo na metodologia de aplicado por pulverização direta causou toxicidade em *A. mellifera*, reduzindo a probabilidade de sobrevivência dessas.

II AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* SOBRE O MODELO BIOLÓGICO *Gallus gallus domesticus*

1 INTRODUÇÃO

Os inseticidas são utilizados para controlar pragas na agricultura. Porém, quando usados por muito tempo ou em grandes quantidades, causam seleção de pragas resistentes, tornando necessário o desenvolvimento de outros tipos de inseticidas mais eficazes (BUENO *et al.*, 2017). Dentre vários estudos procura-se meios naturais como os óleos essenciais para controlar essas pragas, sem prejudicar os organismos não-alvo. Fora isto, é necessário que este meio natural seja tão eficiente quanto outros inseticidas, e que este seja seguro aos organismos não-alvo. Um meio natural é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, família Myrtaceae. Este óleo contém substâncias voláteis, concentradas principalmente nas folhas, possuindo potencial antibactericida, antifúngico e inseticida, podendo ser utilizado como inseticida botânico (PAVIANI *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2009; CRUZ; PAIXÃO, 2021).

Ao longo dos anos, estudos de toxicidade vêm sendo realizados, com o objetivo de encontrar substâncias que sejam tóxicas para pragas, e seletivas para demais espécies. No entanto, estas substâncias tóxicas, utilizadas para controlar pragas podem contaminar alimentos, causando efeitos negativos nos humanos.

Uma ferramenta para detectar os efeitos tóxicos destes componentes é o embrião de galinha *Gallus gallus*. Estes embriões são de fácil acesso e baixo custo, bem como, apresentam curto prazo de desenvolvimento, (21 dias) para se desenvolver desde a fase inicial do embrião até a eclosão do pintinho. Além disso, os ovos são megalécitos, não necessitam do organismo materno para se desenvolver, possuem casca com micro poros para proteção externa do embrião e permitem a passagem de oxigênio através da mesma, possui vitelo com vitaminas e nutrientes necessárias ao longo do desenvolvimento até o nascimento (TAVERNARI; MENDES, 2009). *G. gallus* são amniota (envolvido por uma membrana amniótica). Além disso, o desenvolvimento inicial do embrião de *G. gallus* se assemelha ao de outros vertebrados (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

Devido as características deste embrião, o mesmo é uma ferramenta utilizada como modelo biológico. Embora o estudo do óleo essencial de melaleuca seja realizado de diversos modos de aplicação, ainda é pouco estudado em relação aos efeitos que pode ocasionar em vertebrados. O inseticida (Ci 50 % de clorpirifós e 5 % de cipermetrina) nos estágios iniciais do embrião impediu o desenvolvimento normal do tubo neural e ocasionou o dimorfismo crânio facial em *G. gallus domesticus* (SHARMA *et al.*, 2019). Outro inseticida testado sobre estágios iniciais de embrião foi o Dicofol (Acaricida não sistêmico do grupo dos organoclorados), o qual afetou a sobrevivência de embriões de *G. gallus domesticus*, além disso, reduziu o teor de proteína e atividade da fosfatase do alcalina e glutamato piruvato transaminase, apresentando aumento significativo (NITU *et al.*, 2012).

O embrião de ave serve como modelo biológico e pode ser testado quanto as substâncias, afim de identificar possível toxicidade nesses organismos. Tendo em vista que os estágios iniciais de aves se assemelham com os de outros vertebrados, é possível identificar o potencial tóxico de um inseticida botânico e comparar o modelo animal com os seres humanos. Torna-se necessário elucidar se existe potencial tóxico e se este óleo essencial de melaleuca pode ou não causar danos ao desenvolvimento embrionário de *G. gallus*, comparando os resultados dos estágios iniciais com os de mamíferos. Diante deste cenário, objetivou-se analisar a toxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, sobre o desenvolvimento embrionário do modelo biológico *Gallus gallus domesticus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* de Dois Vizinhos (UTFPR-DV), no Laboratório de Controle Biológico II (LABCON). Antes de iniciar os experimentos, o projeto foi à avaliação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – UTFPR (CEUA protocolo nº 2017-11).

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) utilizado foi fornecido pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-DV). A concentração utilizada foi de 0,75 % com volume de 100 µL da solução por ovo. A solução do óleo essencial de melaleuca foi preparada em água destilada esterilizada contendo Tween 80® a 0,01 % (STENGER, 2021). Já os ovos fertilizados foram adquiridos de uma empresa do município de Dois Vizinhos - PR, a partir de matrizes pesadas da raça Coob de 36 a 40 semanas, e o peso dos ovos foi entre 60 e 65 gramas, os quais estavam em perfeito estado (sem trincas na casca).

2.1 Testes toxicológico em embrião de *Gallus gallus domesticus*

Os ovos foram desinfetados com álcool etílico 70 %, embebido em papel toalha e, posteriormente, cada ovo foi identificado com marcação a lápis, de acordo com os grupos experimentais. O delineamento experimental consistiu em cinco grupos (Tabela 1), com 50 ovos em cada, totalizando 250 ovos. O experimento foi dividido em 5 (cinco) etapas com 10 (dez) ovos de cada grupo por etapa.

Tabela 1 - Grupos experimentais com tratamentos para avaliação toxicológica de Melaleuca a *G. gallus*.

Exposição	Tratamentos	Soluções	Quan. Ovos
Nenhuma	T1 Controle Fechado	-	50
Pulverização externa	T2 Veículo I	290 µL de solução de *Tween 80® a 0,01 %.	50
	T3 OE Melaleuca	290 µL de solução de óleo essencial de melaleuca 0,75 % em Tween 80® a 0,01 %.	50
Injeção interna	T4 Veículo II	100 µL de solução de *Tween 80® a 0,01 %.	50
	T5 OE Melaleuca	100 µL de solução de óleo essencial de melaleuca 0,75% em Tween 80® a 0,01 %.	50

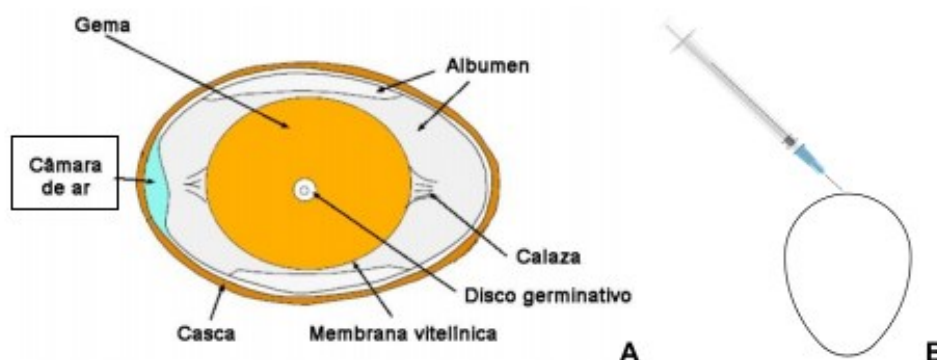
* co-emulsificador que dilui óleo em água

Fonte: autoria própria (2020).

2.1.1 Método de exposição

Os embriões foram expostos aos tratamentos, no tempo E0 (tempo inicial, ou antes, de ser incubado). Com uma agulha (20 × 0,55 mm) foi feita uma perfuração na casca do ovo, na região onde localiza-se a câmara de ar (Figura 1), local que permite melhor dispersão dos agentes sobre o embrião (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Com uma seringa de insulina e uma agulha (13 × 0,38 mm), foram injetados cada um dos tratamentos (Tabela 1).

Figura 1 - Representação esquemática do ovo de *Gallus gallus*. A: partes do ovo. B: Injeção do tratamento na câmara de ar do ovo de *G. gallus*.



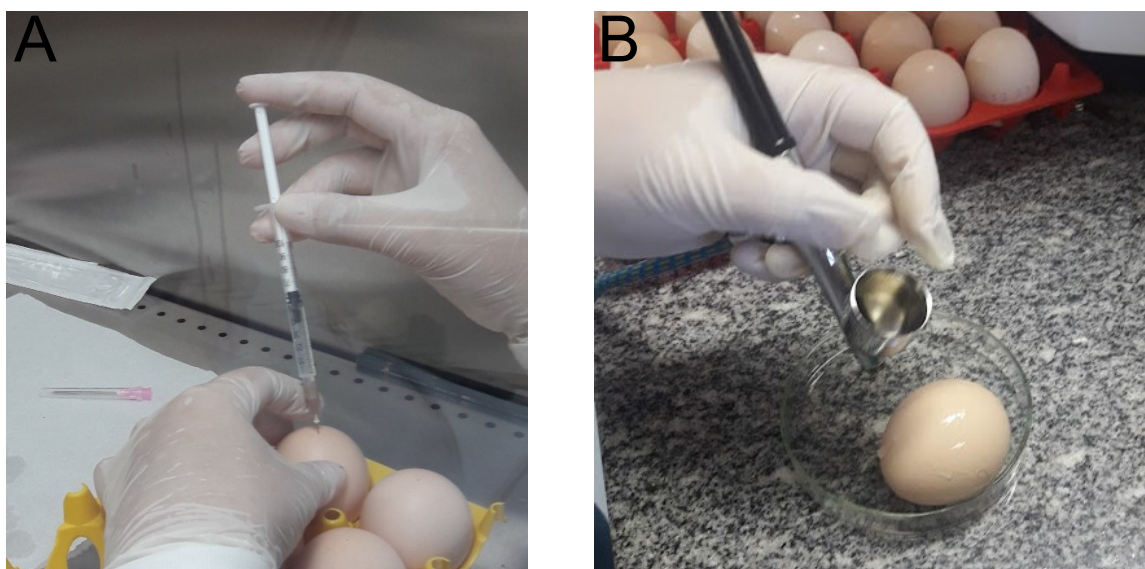
Fonte: Expedição Vida.

Após a injeção, com os respectivos tratamentos, os ovos que foram perfurados foram selados com fita adesiva na extremidade em que foi feito o furo. Na sequência, foram posicionados na bandeja para incubação com a câmara de ar voltada para cima, e incubados por três dias em incubadora, sob temperatura controlada a 37,5 ° C, com umidade e ventilação constantes.

Para os tratamentos T2 e T3 (quatro e cinco) da Tabela 1, os ovos, foram preparados, um a um, em placa de Petri. Posteriormente, os tratamentos foram pulverizados sobre os ovos, no volume de 290 µL, com a utilização de um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®], interligado a uma bomba Tecnal[®] (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm) (Figura 2). O volume pulverizado sobre os ovos foi calculado

conforme a quantidade utilizada por hectare. Os demais procedimentos pós-pulverização foram os mesmos descritos anteriormente.

Figura 2- Aplicação de soluções nos ovos; A- injeção de solução no ovo; B- Pulverização externa no ovo.



Fonte: Autoria própria (2022)

2.1.2 Avaliações da frequência cardíaca

Após a incubação foi realizada uma abertura na casca do ovo, na região da câmara de ar, expondo o embrião para observar o coração e os batimentos cardíacos. A frequência dos batimentos cardíacos foi contabilizada durante 15 segundos e multiplicado por 4, resultando nos batimentos cardíacos por minuto. Os embriões que possuíam batimentos cardíacos foram contabilizados como vivos e os embriões sem batimentos cardíacos contabilizados como mortos e, posteriormente, descartados. Os ovos com embriões vivos foram destinados à análise morfológica.

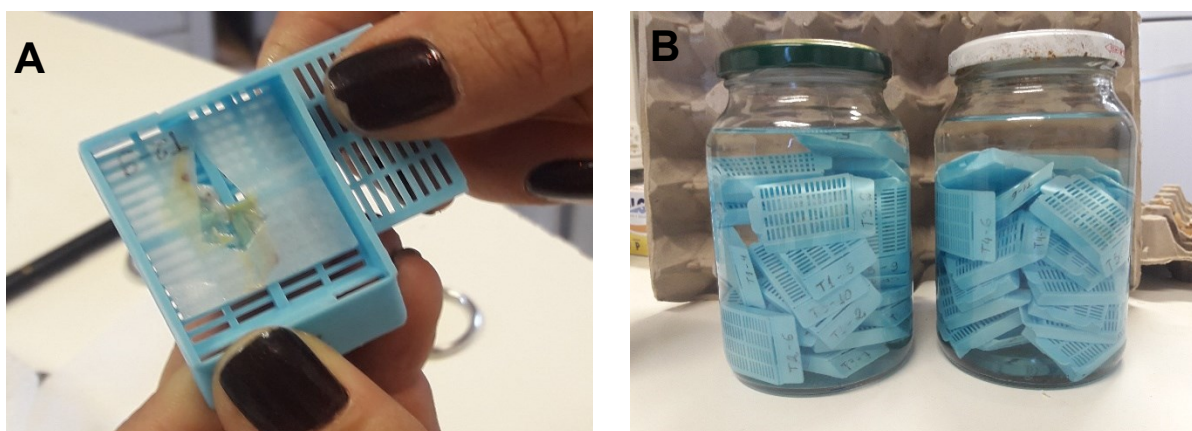
2.1.3 Análise morfológica

Os embriões vivos, oriundos da etapa anterior (2.1.2), foram submetidos a eutanásia, processo que ocorre através do congelamento, seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, 2013). Após a

eutanásia, os embriões foram coletados para análise morfológica pela técnica de montagem total (adaptado de ORTOLANI-MACHADO *et al.*, 2012).

Com o auxílio de pinça reta e tesoura ponta fina, o embrião foi removido do ovo e transferido para uma placa de Petri contendo solução salina, onde foram lavados para remoção e o excesso de vitelo. Em seguida um papel filtro retangular com um recorte em losango na região central foi encaixado sobre o embrião para mantê-lo distendido (Figura 3 A). Na sequência, uma solução fixadora de Carnoy (100 mL de ácido acético glacial com 300 mL de etanol 100 %) foi gotejada sobre o embrião. Os embriões então foram transferidos para cassete histológico para processamento histológico e fixados em Carnoy, por 2 horas, a temperatura ambiente, em frasco fechado (Figura 3 B). Depois, foram lavados em água destilada e colocados em álcool etílico 70 %, onde permaneceram por, no mínimo, 8 horas.

Figura 3- coleta do embrião, (A) embrião alocado no cassete para recebimento de fixador, (B) embrião já na solução fixadora de Carnoy.



Fonte: Autoria própria

Os embriões foram colocados em água destilada para reidratação por 10 minutos e expostos em solução corante Carmalúmen de Mayer, onde foram corados durante 48 horas. Após a coloração, estes foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70%, 90% e 95% por 10 minutos em cada, 100% I e 100% II por 15 minutos em cada) e diafanizados com dois banhos de Xilol (10 minutos em cada). Para a montagem das lâminas permanentes, foram utilizados o bálsamo do Canadá e lamínula.

A análise e registro fotográfico foram realizados em estereomicroscópio Zeiss modelo S temi 305 transmitida pelo programa Zeiss 2.3 lit com câmera Axiocam ERc 5s. As más-formações (gastrosquise, raquisquise lombar, falha na segmentação na mesoderme, hipotrofia caudal, separação em lambda entre outras) e estádios (fase do desenvolvimento em que o embrião se encontra) do embrião foram determinados de acordo com a descrição de (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) as análises foram feitas juntamente com uma especialista na área de embriologia.

2.2 Análise estatística

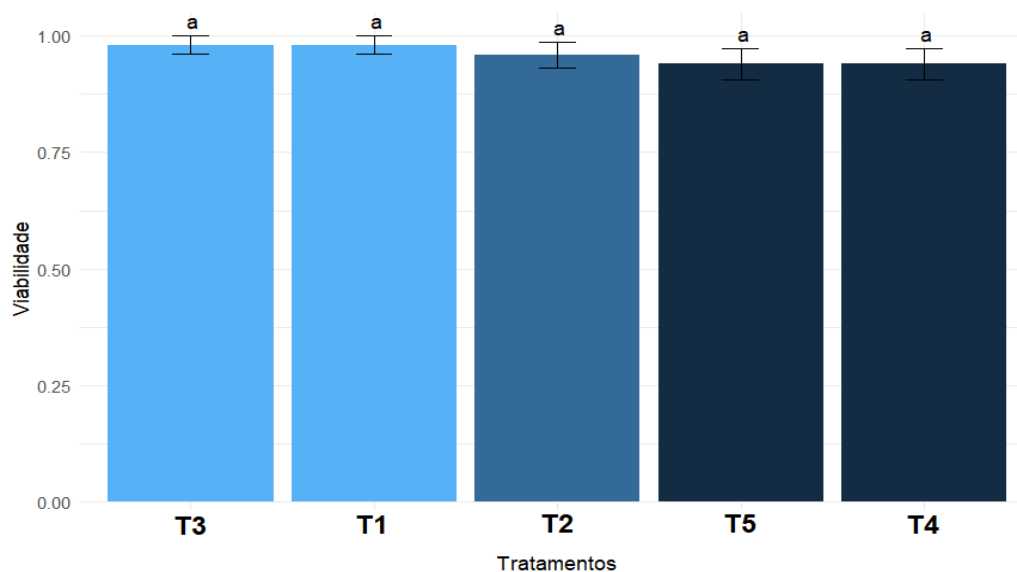
Para os embriões de *Gallus gallus* foi levado em conta a contagem de batimentos cardíacos e com o software R Core Team (2021) foi extraído os resultados de média e variância. Com cinco variáveis distintas (controle fechado, Tween interno, melaleuca interna, Tween externo e melaleuca externa) para as variedades distintas. A análise de sobrevivência e má-formação como variáveis de sobrevivência, conduzida por modelo linear generalizado. Para a variável frequência cardíaca trabalhou-se modelos lineares generalizados. Por fim, como a variável estágio de desenvolvimento é qualitativa ordinal, optou-se por aplicar o teste não paramétrico de Kruskal- wallis. Caso se constate o efeito de tratamento, se aplica o método de Dunn (CORDER *et al* 2011). O modelo foi ajustado pelo método da máxima verossimilhança. Então foi aplicada análise de desviância (razão de verossimilhanças e teste de qui quadrado). Se o teste for significativo à 5%, conclui-se que existe o efeito de algum dos tratamentos.

3 RESULTADOS

3.1 Teste toxicológico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre embriões de *Gallus gallus domesticus* nos métodos de pulverização (externo) e injeção (interno)

O óleo essencial de melaleuca utilizado nas diferentes metodologias (por injeção e pulverização) não provocou alteração na viabilidade dos embriões de *G. gallus* ($p = 0,7034$) (Figura 4).

Figura 4 – Viabilidade dos embriões de *Gallus gallus domesticus* quando testados com o óleo essencial de *M. alternifolia* nas diferentes metodologias (pulverização e injeção)

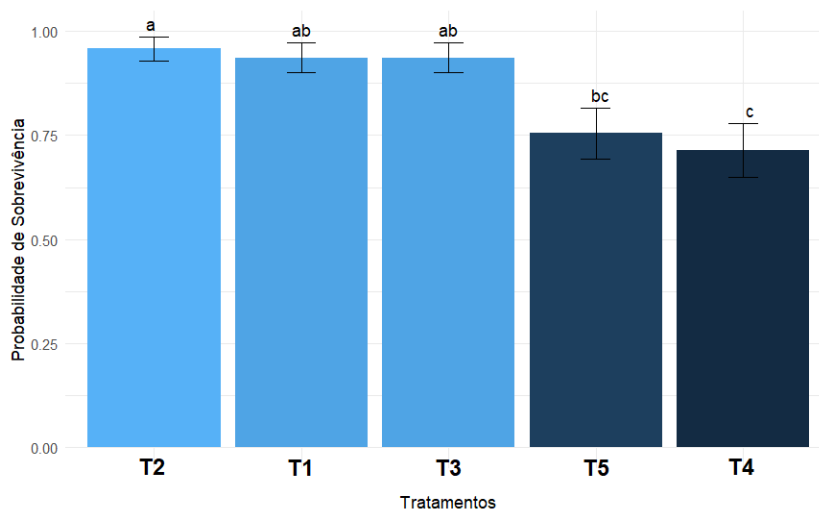


T1 = Controle fechado; **T2** = Pulverização externa Tween (veículo I); **T3** = Pulverização externa óleo essencial de melaleuca; **T4** = Injeção interna Tween (veículo II); **T5** = Injeção interna óleo essencial de melaleuca.

Fonte: Autoria própria (2022)

O tratamento T4 (injeção interna Tween) reduziu a probabilidade de sobrevivência de *G. gallus* quando comparado aos tratamentos T2 (Pulverização externa Tween), T1 (Controle fechado) e pulverização externa de melaleuca. Entretanto, não diferiu do T5 (Injeção interna óleo essencial de melaleuca) ($p \leq 0,01$) (Figura 5).

Figura 5 – Probabilidade de sobrevivência dos embriões de *G. gallus* submetido aos tratamentos contendo Óleo essencial de *M. alternifolia*

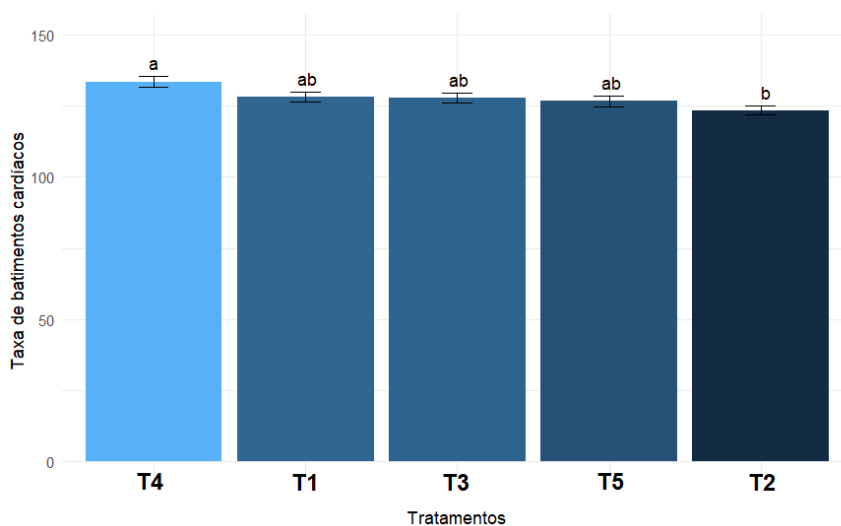


T1 = Controle Fechado; **T2** = Pulverização externa Tween (veículo I); **T3** = Pulverização externa óleo essencial de melaleuca; **T4** = Injeção interna Tween (veículo II); **T5** = Injeção interna óleo essencial de melaleuca.

Fonte: Autoria própria (2022)

O tratamento T2 (Pulverização externa Tween) reduziu a taxa de batimentos cardíacos de *G. gallus* quando comparado ao tratamento T4 (Injeção interna Tween). Não diferindo dos demais tratamentos ($p \leq 0,01$) (Figura 6).

Figura 6 – Taxa de batimentos cardíacos dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetido a tratamentos contendo Óleo essencial de *M. alternifolia*.

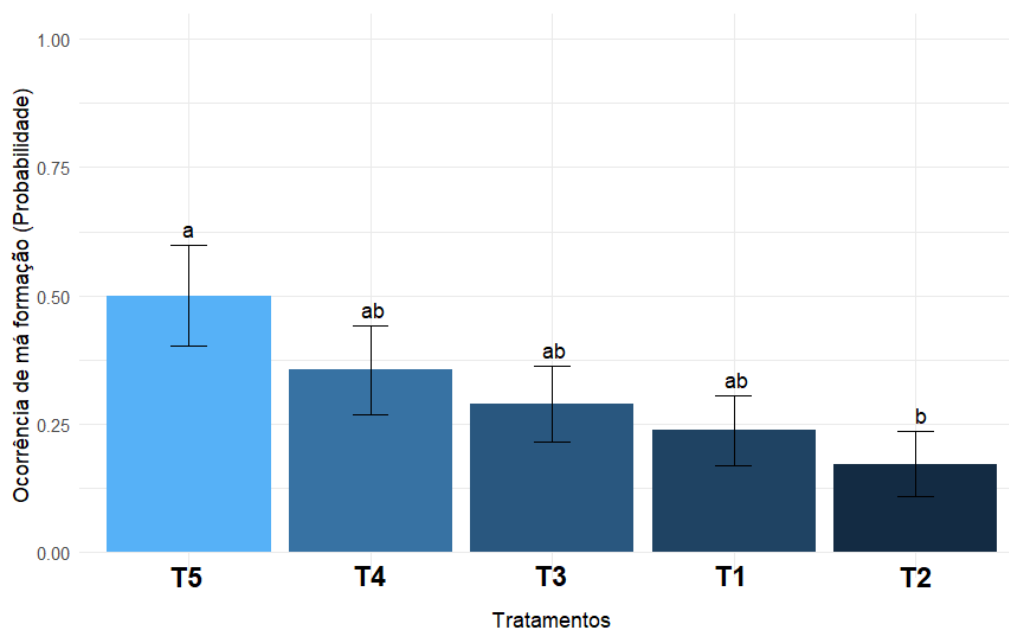


T1 = Controle fechado; **T2** = Pulverização externa Tween (veículo I); **T3** = Pulverização externa óleo essencial de melaleuca; **T4** = Injeção interna Tween (veículo II); **T5** = Injeção interna óleo essencial de melaleuca. ($p < 0.01$)

Fonte: Autoria própria (2022)

O tratamento T5 (injeção interna do óleo essencial de melaleuca) provocou aumento na probabilidade de má-formação embrionária em *G. gallus* quando comparado ao tratamento T2 (Pulverização externa Tween). Entretanto, não diferiu dos demais tratamentos ($p < 0,49$) (Figura 7).

Figura 7 – Probabilidade de ocorrência de má-formação em embriões de *Gallus gallus domesticus* após tratamento com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*



T1 = Controle fechado; **T2** = Pulverização externa Tween (veículo I); **T3** = Pulverização externa óleo essencial de melaleuca; **T4** = Injeção interna Tween (veículo II); **T5** = Injeção interna óleo essencial de melaleuca. ($p < 0.049$)

Fonte: Autoria própria (2022)

Os tratamentos, independentemente do método de aplicação, não interferiram nos estádios de desenvolvimento dos embriões de *G. gallus* (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de embriões por estágio de desenvolvimento e por grupo experimental

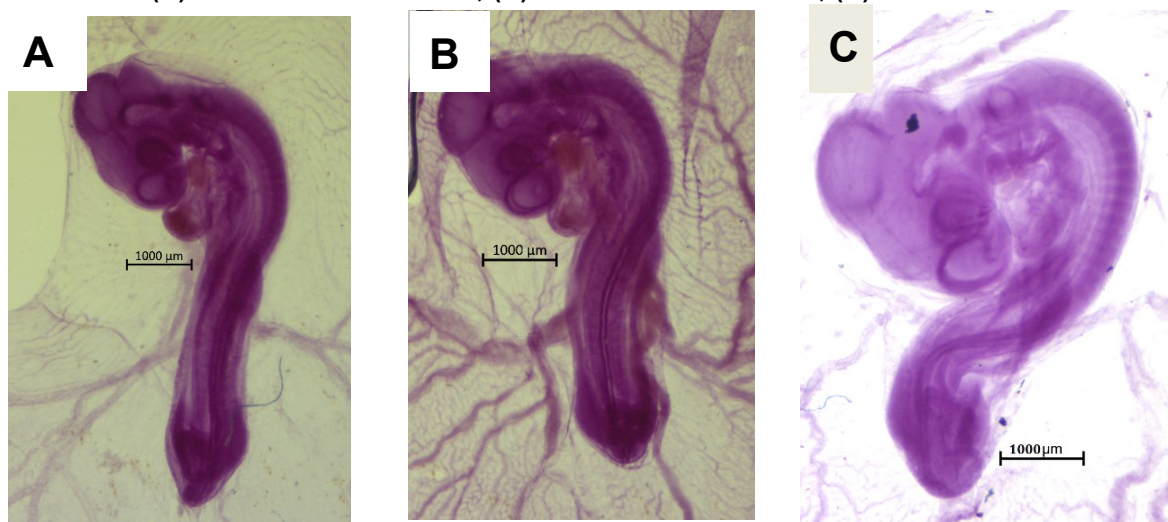
Tratamentos	15	16	17	18	19	20	Média dos postos
T1	-	02	16	16	04	-	77.60526 ^a
T2	-	03	10	17	06	-	87.29167 ^a
T3	-	01	09	11	01	01	80.04054 ^a
T4	01	01	11	14	01	-	74.17857 ^a
T5	-	01	10	23	02	-	90,13043 ^a

T1 = Controle fechado; **T2** = Pulverização externa Tween (veículo I); **T3** = Pulverização externa óleo essencial de melaleuca; **T4** = Injeção interna Tween (veículo II); **T5** = Injeção interna óleo essencial de melaleuca.

Fonte: Autoria própria (2023)

Os embriões de *G. gallus* submetidos aos tratamentos oriundos da metodologia de pulverização e injeção, apresentaram os estádios de desenvolvimento 15, 16, 17, 18 e 19. Na figura 8A observa-se o embrião de *G. gallus* no estágio 17, sem má-formação. Na Figura 8B verifica-se o embrião de *G. gallus* no estágio 18 sem má-formação e na Figura 8C o embrião de *G. gallus* no estágio 19 de desenvolvimento, sem má-formação.

Figura 8 – Comparação de diferentes estádios dos embriões de *G. gallus domesticus* sem anomalias. (A) estágio 17 do embrião; (B) estágio 18 do embrião; (C) estágio 19 do embrião.

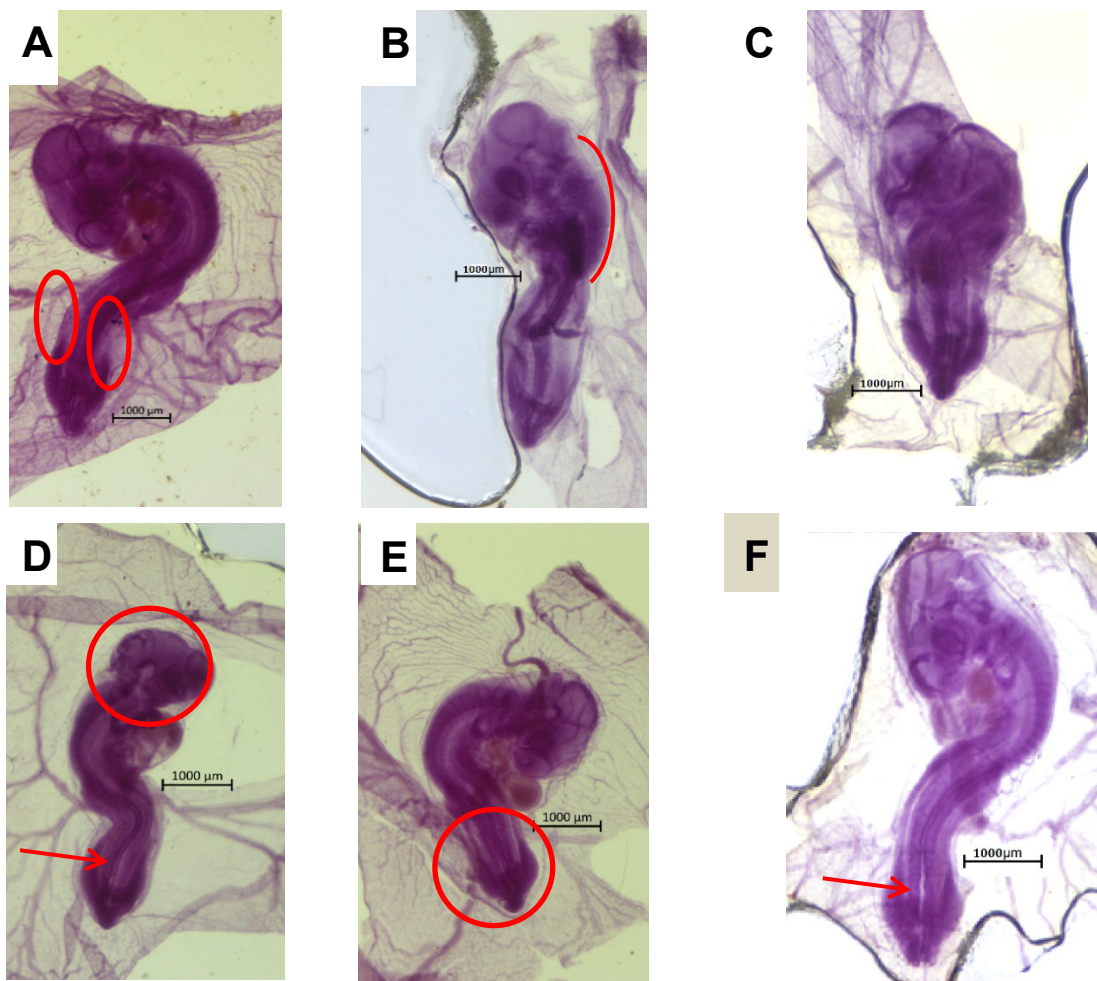


Fonte: Autoria própria (2022)

Ainda na análise dos embriões de *G. gallus* que receberam os tratamentos contendo óleo essencial de melaleuca, em diferentes metodologias, alguns embriões apresentaram anomalias, as quais estão representadas na Figura 9A, B, C, D, E e F. O embrião registrado na Figura 9A representa o estágio 18, é oriundo do T3 (Pulverização externa óleo essencial de melaleuca) o qual apresentou gastrosquise. O embrião (Figura 9B) oriundo do T1 (controle fechado), está no estágio 17 e apresentou escoliose lombar. O embrião (Figura 9C) oriundo do T4 (injeção interna Tween) está no estágio 18 e apresentou má-formação generalizada. O embrião (Figura 9D) oriundo do T5 (injeção interna óleo essencial de melaleuca) está no estágio 17 e apresentou má-formação severa na região cefálica e raquisquise caudal. O embrião representado na Figura 9E é oriundo do T5 (injeção interna óleo essencial de melaleuca, estágio 17, apresentou atrofia caudal em seu desenvolvimento e o embrião (Figura 9F) oriundo do T5, estágio 18, apresentou

raquisquise caudal. Esses não foram os únicos embriões com más-formações, outros embriões foram observados e registrados.

Figura 9 – Comparação de diferente má-formações de *G. gallus domesticus*. (A) Embrião com gastrosquise; (B) Embrião com escoliose lombar; (C) Embrião com má formação generalizada; (D) Embrião com raquisquise, região cefálica com má formação severa; (E) Embrião com trofia caldal; (F) Embrião com raquisquise caudal.



Fonte: Autoria própria (2022)

4 DISCUSSÃO

Devido as semelhanças no desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus* com seres humanos (SUTENDRA; MICHELAKIS, 2007; KAIN *et al.*, 2014), especialmente nas primeiras 48 horas de desenvolvimento (UMUR *et al.*, 2012), os ovos desta ave vêm sendo amplamente utilizados permitindo extrapolar os resultados quanto aos riscos da exposição humana a agentes contaminantes (KAIN *et al.*, 2014). Estes embriões são usados em testes de teratogenicidade e embriotoxicidade com produtos e poluentes químicos a fim de investigar os efeitos de diferentes produtos nos estágios iniciais da vida dos vertebrados (YAMAMOTO *et al.*, 2012).

Outro fator importante que torna viável o uso de ovos de *G. gallus* é seu baixo custo e facilidade de manejo, além de possuir um rápido desenvolvimento e, conseqüentemente, resultados em menor espaço de tempo (VANCAMP; DARRAS, 2017; KOHL *et al.*, 2019). Este embrião também é, frequentemente, preferido para estudos *in vivo* (ATAY *et al.*, 2020). Além de ser utilizado nos últimos anos, em estudos envolvendo o comportamento de compostos químicos no desenvolvimento embrionário (UMUR *et al.*, 2012, ERTEKIN *et al.*, 2019; TURGUT *et al.*, 2019).

Verifica-se que é amplo o uso dos embriões de *G. gallus* para investigações de diferentes compostos, produtos químicos sintéticos e naturais, e comprovados em estudos anteriores por diversos pesquisadores, como Blokpoel; Hamilton (1989), Molina *et al.* (2006), Mckernan *et al.* (2009), Chaudury *et al.* (2017), Salvaggio *et al.* (2018), Ertekin *et al.* (2019), Bovolenta; Martinez-Morales (2019), Turgut *et al.* (2019), Atay *et al.* (2020), Gomes *et al.* (2020), Arcain *et al.* (2021), dentre outros. O presente estudo utilizou o modelo de embrião de *G. gallus domesticus* para analisar a toxicidade do óleo essencial de melaleuca sobre o seu desenvolvimento embrionário.

O óleo essencial de melaleuca utilizado não afetou a viabilidade de *G. gallus domesticus*, a probabilidade de sobrevivência, a taxa de batimentos cardíacos e o estágio de desenvolvimento embrionário. Entretanto, provocou uma taxa maior de embriões com má-formação, quando este óleo foi injetado na câmara de ar. Quando pulverizado externamente, o óleo essencial de melaleuca não provocou alterações. Esta ausência de efeito negativo, quando o óleo foi pulverizado externamente, está

associado, muito provavelmente, com a proteção conferida pela casca do ovo de *G. gallus*.

A casca do ovo possui finalidade de proteger o embrião e garantir o seu desenvolvimento, é formada através da deposição de uma membrana calcária dura que possui propriedades isolantes (AMOS; RAHN, 1985; RAHMAN, 2015). De modo que, para garantir as trocas gasosas, a casca do ovo contém microporos, que possibilitam a troca de oxigênio e dióxido de carbono entre embrião e ambiente externo (AMOS; RAHN, 1985; BLOKPOEL; HAMILTON, 1989; RAHMAN, 2015). Nesses microporos pode ocorrer a infiltração de microrganismos patogênicos, causando contaminação do ovo. O óleo essencial de melaleuca, pulverizado externamente nos ovos, não interferiu nas trocas dos gases, pois não provocou alteração nos parâmetros biológicos analisados. Ao mesmo tempo, este óleo pode ter auxiliado na proteção contra os microrganismos patogênicos que podem estar presentes na casca do ovo, uma vez que há trabalhos que já comprovaram este efeito.

Neste sentido, os resultados encontrados no presente estudo, demonstram que há a possibilidade do tratamento contendo óleo essencial de melaleuca, quando pulverizado externamente ter sido benéfico para o desenvolvimento do embrião de *G. gallus*. Estudos anteriores relatam as propriedades antiviral (GAROZZO *et al.*, 2009), antimicótica (OLIVA *et al.*, 2003; KUMAR, PS, 2020; LANTU XIONG, *et al.* 2022), anti-inflamatória (HART *et al.*, 2000; CALDEFIE-CHÉZET *et al.*, 2006), antimicrobiana (CARSON; RILEY, 1993; LIU *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2014; BRUN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; ELMI *et al.*, 2019), anticancerígenas (LIU *et al.*, 2009; BYAHATTI *et al.*, 2018a; BYAHATTI *et al.*, 2018b), inseticidas (LIAO *et al.*, 2016) e antioxidantes (ZHANG *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019) do óleo essencial de melaleuca em diferentes organismos. Apesar de tantos benefícios o óleo essencial de melaleuca injetado no interior dos ovos de *G. gallus domesticus*, provocou má-formação embrionária. Neste mesmo sentido, o óleo mineral branco reduziu a eclosão de *G. gallus* e *Larus delawarensis* (gaivotas) além de reduzir o tempo de sobrevivência destes, quando injetado na gema (BLOKPOEL; HAMILTON, 1989).

A classe de surfactantes não iônicos Tweens vem sendo utilizada extensivamente nos últimos tempos, tanto pela indústria farmacêutica quanto em diversos ensaios toxicológicos. Seu amplo uso está relacionado a sua eficiência,

sem alterar ou influenciar o meio utilizado de forma tóxica ou interagir com os ingredientes ativos (WANG *et al.*, 2008). Tween20[®] e Tween80[®] possuem atividade inibitória na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em leucócitos humanos e efeito estimulador na atividade de mieloperoxidase (MPO), nas concentrações normalmente utilizadas como solventes em testes experimentais (PÉREZ-ROSÉS *et al.*, 2014). A MPO é uma enzima importante para o sistema imunológico humano, possui função antimicrobiana, atuando no combate a diversos patógenos invasores, além de participar da via bioquímica de produção de EROs (KOCH *et al.*, 2021). Embora a MPO atue de forma importante no combate a patógenos e microrganismos causadores de doenças, sua produção de forma exagerada pode contribuir para o aumento de algumas doenças relacionadas a inflamações dos tecidos, através de danos provocados no DNA celular, até mesmo sem a ocorrência de uma infecção prévia (KOCH *et al.*, 2021).

Normalmente as atividades antioxidantes e as ERO encontram-se em equilíbrio. Quando há desequilíbrio entre estes, ocorrendo aumento de EROs, ocorre o estresse oxidativo, que pode gerar efeitos deletérios no organismo dos seres humanos, podendo ocasionar lesões em nível de DNA celular, provocando alterações negativas no processo de formação de embriões. Logo a redução na produção de EROs é desejada (ANDRADE *et al.*, 2010). Na dieta de ratos foram testados os efeitos do Tween 80[®] quanto ao tamanho e número de quilomícrons (CM) durante a absorção lipídica, o qual foi efetivo na absorção intestinal, no entanto em doses mais altas apresenta efeito tóxico ou irritante no sistema gastrointestinal (DHER, *et al.*, 2003). O surfactante Tween 80[®] aumentou a taxa de oxidação geral e a dependência de temperatura no armazenamento da proteína IL-2 muteína (WEI WANG *et al.*, 2008).

Diante do exposto, pode-se observar que Tween 80[®] utilizado como veículo, injetado internamente na câmara de ar do ovo reduziu a sobrevivência dos embriões, além disso, elevou a taxa de batimentos cardíacos o que indica aumento na taxa metabólica dos embriões, provocando sua morte. No entanto, nos tratamentos com óleo essencial de melaleuca e Tween 80[®], como tensoativo, pulverizado, pode ter beneficiado a atividade antioxidante e antimicrobiana, do óleo essencial de melaleuca, por melhorar a dispersão do mesmo. Ainda assim, novos estudos devem ser realizados para investigar outros efeitos em embriões de *G. gallus domesticus*.

Quando se estuda novos compostos, como é o caso do óleo essencial de melaleuca, com objetivo de inseticida botânico, testes dos efeitos sobre organismos não-alvo são fundamentais. Estes testes permitem a compreensão sobre os potenciais impactos toxicológicos e teratogênicos, facilitam a adoção ou não de determinado produto (VIEIRA *et al.*, 2019). Nesse sentido, os embriões de *G. gallus domesticus* que receberam os tratamentos foram avaliados quanto a presença de má-formações. Os embriões de *G. gallus* oriundos de todos os tratamentos apresentaram as má-formações gastrosquise, escoliose lombar, má-formação generalizada, região cefálica com má-formação severa, atrofia caudal e raquisquise caudal.

O cogumelo *Ganoderma lucidum* também ocasionou má-formação em embriões de *G. gallus*, os quais apresentaram gastrosquise, atrofia caudal, falha no desenvolvimento do telencéfalo, má-formação total (CRUZ *et al.*, 2021).

A gastrosquise é um defeito congênito que ocorre na parede abdominal, devido à ausência ou falha no fechamento da parede corporal ventral, assim, ocorre a formação de hérnias com possíveis protusões das vísceras abdominais através dessa abertura (ROCHA; DELGADO, 2007; SADLER; FELDKAMP, 2008). Apesar da possibilidade de correção desse defeito, a associação com outras comorbidades relacionadas podem levar a letalidade de embriões e recém-nascidos com essa condição (LAO *et al.*, 2010).

Outra má-formação encontrada nos embriões foi a escoliose, relacionados a falhas de rotação do tubo neural. É um sinal morfológico de assimetria corporal que pode acarretar em graves problemas de locomoção (GOMES *et al.*, 2020). Problemas com má-formação generalizada e/ou região cefálica com má-formação severa são irreversíveis e letais aos embriões de *G. gallus*. Os inseticidas Marshal® e indoxacarbe causam alterações teratológicas (anomalias qualitativas, como microcefalia, hidrocefalia, inchaço edematoso, formação de hematoma, coloração corporal anormal, microftalmia, bico deformado, agnatia, micromelia, amelia, onfalocele e ectopia cardis) em embriões de *G. gallus domesticus*, sendo inseticidas que se mostraram nocivos ao desenvolvimento de embriões de aves e devem ser utilizados com cuidado (ABBAS *et al.*, 2020; MATHUR *et al.*, 2013).

O cádmio afeta o desenvolvimento inicial de embriões de *G. gallus*, provocando alterações na região caudal, má-formações da região cefálica, principalmente no prosencéfalo, bem como, atrofia cardíaca, vesículas ópticas

anormais e formatos de fossas auditivas e falha no fechamento do tubo neural, ou ainda ausência de formação dessas estruturas (YAMAMOTO *et al.*, 2012). O glutamato monossódico causa efeitos no desenvolvimento de embriões de *G. gallus*, resultando em deformidades congênitas de vários órgãos como cérebro (raquisquise e anencefalia), retardo de crescimento, morte embrionária, entre outros (ROONGRUANGCHAI *et al.*, 2018).

Entretanto, anormalidades congênitas podem ocorrer até mesmo em ambientes naturais, visto que podem não ter relação direta com o produto testado, que podem então, ser consideradas falhas inerentes ao desenvolvimento embrionário (YAMAMOTO *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2021). De acordo com vários estudos, de 2 a 3% dos recém-nascidos de seres humanos é detectado pelo menos um tipo de anomalia e 0,7% têm múltiplas anomalias severas, sendo que essa porcentagem dobra quando detectado anomalias durante os primeiros anos de vida. Isto pode estar associado entre a herança genética e o ambiente de desenvolvimento do embrião (NAZARI; MULLER, 2011). Falhas no desenvolvimento embrionário podem ocorrer tanto nos modelos biológicos quanto no desenvolvimento de qualquer embrião.

Várias características como o curto tempo de desenvolvimento, ovo megalécito, ausência do organismo materno para o desenvolvimento, entre outras características, fazem do embrião de *G. gallus domesticus* um excelente modelo biológico. Além disso, é possível avaliar os efeitos de agentes químicos ou biológicos sobre o desenvolvimento embrionário. Ainda os estágios iniciais podem ser comparados com os estágios iniciais de mamíferos.

Ao utilizar a metodologia de pulverização externa do óleo essencial de melaleuca verificou-se ausência de efeito negativo nos embriões, no entanto deve-se evitar a utilização deste óleo de forma interna, como injeção, o que, apesar de ser metodologia padrão para análise, dificilmente ocorrerá no ambiente. O óleo essencial de melaleuca se mostrou seguro para embriões de *G. gallus* quando pulverizado externamente, sendo este embrião, um modelo biológico adequado para os testes toxicológicos e teratogênicos de outros óleos essenciais.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na pulverização externa não foi tóxico ao modelo biológico, *Gallus gallus domesticus*. Por outro lado, este óleo, injetado na câmara de ar é teratogênico para os embriões de *Gallus gallus domesticus* aumentando a probabilidade de má-formações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a ampliação de paisagens agrícolas e agroecossistemas há aumento da utilização de inseticidas. No entanto, a utilização inadequada desses inseticidas é prejudicial aos organismos não-alvo como a abelha (que exerce um papel fundamental como polinizadora) e aos vertebrados (organismos não-alvo). Dentre vários estudos em relação a inseticidas, muitos trabalhos apontam os efeitos negativos que estes causam sobre estes indivíduos, sejam eles, fatores fisiológicos ou comportamentais, de médio a longo prazo.

Há aumento nos estudos sobre inseticidas botânicos (extratos, óleos essenciais, dentre outros) e organismos não-alvo. Uma vez que estes podem substituir os inseticidas sintéticos tendo a mesma eficácia e causando menos impacto ao ambiente, porém, há ainda, uma lacuna no conhecimento sobre seus efeitos em vários organismos.

O óleo essencial de *M. alternifolia* age de forma seletiva para *A. mellifera*, desde que, a mesma não receba o tratamento de forma direta. Pode se utilizar o óleo essencial de *M. alternifolia* nos horários em que ocorre menor atividade de forrageamento desses insetos. Além disso, o óleo essencial de *M. alternifolia* aplicado por pulverização externa não apresenta toxicidade a embriões de *Gallus gallus*. Nesse sentido, pode ser considerado seguro para outros vertebrados. Mesmo assim, enfatiza-se a necessidade de estudos envolvendo concentrações diferentes deste óleo, testes em outros modelos biológicos ou análises como morfométricas, moleculares e bioquímicas sobre diferentes grupos de organismo. Também sugere-se analisar o potencial deste óleo, bem como sua segurança, quando associado com outros métodos de controle. Neste sentido, os testes podem ser realizados sobre *A. mellifera* e *G. gallus domesticus* que se mostram bons modelos biológicos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS; IQBAL; *et al.*, Teratogenic Effects of Chlorantraniliprole on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Indian journal of animal research** **52 (5)**, pp.669-673, 2020.
- ABATI, RAIZA ; SAMPAIO, AMANDA ROBERTA ; Maciel, R.A. ; Colombo, F. ; LIBARDONI, G. ; BATTISTI, L. ; EVERTON, RICARDI LOZANO ; DE CASTILHOS GHISI, NÉDIA ; COSTA-MAIA, FABIANA M. ; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. *Environmental Science and Pollution Research* , v. 5, p. 1, 2021.
- ADANE; ASRES, *et al.*, **The Developmental Toxicity of Thymus schimperi Essential Oil in Rat Embryos and Fetuses**. *Journal of toxicology*, 2022.
- AGRESTI, A. *An introduction to Categorical Data Analysis*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996.
- AMOS, A. R.; RAHN, H. Pores in avian eggshells: gas conductance, gas exchange and embryonic growth rate. **Respiration physiology**, v. 61, n. 1, p. 1-20, 1985.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ARCAIN, B. M. S. *et al.* Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, n. 15, p. 632-648, 2021.
- ATAY, E. *et al.* Impact of Bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 17, p. 1386-1396, 2020.
- ALIX; *et al.*, Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environmental Toxicology*. Vol. **20 is.11**, pg. **2530-2536**. 2001. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.5620201119>
- BAIRD; TICHIT; GUIRAUD. The neuroecology of bee flight behaviours. **Current Opinion in Insect Science**. Vol. 42, Pg. 8-13, December 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.07.005>
- BALBUENA; *et al.*, Efeitos de doses subletais de glifosato na navegação de abelhas. **J Exp Biol** 218:2799-2805. 2015. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1242/jeb.117291>
- BARBERI; BURGIO; DINELLI; MOONEN; OTTO; VAZZANA; ZANIN. Biodiversidade funcional na paisagem agrícola: relações entre plantas daninhas e fauna de artrópodes: interações entre plantas daninhas-artrópodes na paisagem *Erva Res.* , 50 (2010)
- BARBOSA; PAULA *et al.* Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE) *Quim. Nova*, Vol. 27, 2004.
- BAPTISTA, *et al.* **Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.4, p.955-961, jul, 2009. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11673/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y> acesso em: 25/02/2020 as 13:15.
- BATTISTI; CAON E DE CAMPOS. **A short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil**. *Journal of drug delivery science and technology* 63. 2021.
- BASU, N. *et al.* Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken and yellow perch. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, v. 157, n. 3, 2013.

BEECHER, N.A.; *et al.* **Agroecology of birds in organic and nonorganic farmland.** Conservation Biology, dezembro, 2002. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/3095418> Acesso em: 18/01/2022 as 20:51

BELLAIRS. & OSMOND. **The Atlas of Chick Development Third Edition.** Editora: Academic Press, 2014.

BETTIOI. **Controle alternativo de doenças de plantas.** Embrapa Meio Ambiente, Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais (III COBRADAN), Jaguariúna, SP. 2006. Brasil. Bolsista do CNPq. Palestras / Conferences, p.43-158, 2006.

BIRD; *et al.*, **Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health.** Journal of applied ecology 58 (5) , pp.997-1005, Jan 2021.

BOMMARCO, R.; MARINI, L.; VAISSIÈRE, B. E. Insect pollination enhances seed yield, quality, and marked value in oilseed rape. *Oecologia*, v. 169, p. 1025-1032, 2012.

BLOKPOEL; HAMILTON. Effects of applying white mineral oil to chicken and gull eggs. **Wildlife Society Bulletin**, p. 435-441, 1989.

BOVOLENTA, P.; MARTINEZ-MORALES, J. R. Genetics of congenital eye malformations: insights from chick experimental embryology. **Human Genetics**, v. 138, n. 8, p. 1001-1006, 2019.

BRAIMAH; MOCHIAH; *et al.* Manejo sustentável de duas pragas- chave do repolho, *Brassica oleracea* var. capitata L. (Brassicaceae), utilizando extratos caseiros de alho e pimenta. *Agricultura orgânica*, 3 (3-4), 163-173, 2014.

BRAGA; CRUZ, *et al.*. **Effect of essential oils of *Mentha spicata* L. and *Melaleuca alternifolia* Cheel on the midgut of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae).** *Acta Histochemica*. Volume 122, Issue 3, April 2020,

BRIGHENTI, D. M. *et al.* BIOATIVIDADE do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 279–289, 2007.

BRUN, P. *et al.* In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.

BUENO, V.H.B. *et al.* Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável, Departamento de Entomologia/UFLA, 2017.

BURGGREN; *et al.*, Cardio-respiratory development in bird embryos: new insights from a venerable animal model. **Invited Review. R. Bras. Zootec. Nov 2016**

BUZZI Z.J.; MIYAZAKI R.D. **Entomologia didática.** Curitiba: UFPR, 262 p. 1993.

BYAHATTI, S. M. *et al.* Evaluation of anticancer activity of *Melaleuca alternifolia* (ie, tea tree oil) on colon cancer cell line (HT29)-An in vitro study. **Journal of Advanced Clinical and Research Insights**, v. 5, n. 4, p. 99, 2018a.

BYAHATTI, S. *et al.* Evaluation of anticancer activity of *Melaleuca alternifolia*. (ie tea tree oil) on Leukemia cancer cell line (K562): An in vitro study. **Journal of Medicinal Plants**, v. 6, n. 5, p. 01-06, 2018b.

CAMPOS, B. M. *et al.* Diversity and distribution patterns of medium to large mammals in a silvicultural landscape in south-eastern Brazil. *iForestBiogeosciences and Forestry*, v. 11, n. 6, p. 802, 2018.

CAETANO; CARDOSO, *et al.*, *Rosmarinus officinalis* essential oil incorporated into nanoparticles as an efficient insecticide against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Austral entomology**. Março 2022.

CALDEFIE-CHÉZET, F. *et al.* Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 20, n. 5, p. 364-370, 2006.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 49-55, 1993.

CAVALARI; OLIVEIRA. **Essential oil of *Melaleuca***. Revista Saúde em Foco – Edição nº 9 – Ano: 2017.

CHAPMAN, *et al.* Genetic origins of honey bees (*Apis mellifera*) on Kangaroo Island and Norfolk Island (Australia) and the Kingdom of Tonga Apidologie, 50, pp. 28-39. 2019.

CHIARI, W. C. *et al.* **Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [Glycine max (L.) Merrill] Roundup Ready™** cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. Acta Scientiarum. Agronomia, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008

CHAUDURY, S. *et al.* Toxic Effects of Chlorpyrifos on 12th Day Desi Chick Embryo (*Gallus gallus domesticus*). **The Nucleus**, v. 54, n. 2, p. 135-139, 2017.

COLOMBO, F. C. **TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia uniflora* E *Pogostemon cablin* A OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, 2019.

CONAB. **Safra Brasileira de Grãos**. Boletim da Safra de Grãos. Companhia Nacional do Abastecimento. 2022 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos> acessa as 30/05/2022.

CONCEA - Ministério da ciência, tecnologia e inovação conselho nacional de controle de experimentação animal. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, 2013.

CONWAY, G.R. **The Properties of Agroecosystems**. Agricultural Systems. 24:95-117.1987.

CORAZZA, S. **Aromocologia. Uma ciência de muitos cheiros**. 3º Ed. São Paulo, SP. Senac, 2004.

COUTO, R.H.; COUTO, LA **Apicultura - manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002.

CLERIC; SOUZA, *et al.*, **Effects of nanostructured essential oils against subterranean termites (*Coptotermes gestroi*)**. Journal of applied entomology 142 (4), pp.406-412. 2018.

CORDER, GREGORY W, and Dale I. Foreman. Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach. John Wiley & Sons. 2011.

CRUZ E PAIXÃO. Aplicación de Aceite Esencial de *Melaleuca alternifolia* (TEA TREE) en el tratamiento del acné vulgar. Salvador – BA. Artigos. Com | Vol. 29 | e7657, 2021.

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**, v. 65, n. 1, p. 47-57, 2021.

DHER, *et al.* Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food and Chemical Toxicology**. Vol 41, Issue 4, Pg. 575-582, April 2003. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00299-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00299-5)

DELAFLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop Pollination by Bees**. Wallingford, UK: CABI, 2000.

DILLMANN; COSSETIN; *et al.* **Adulticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtales: Myrtaceae) Essential Oil With High 1,8-Cineole Content Against Stable Flies (Diptera: Muscidae).** *Journal of economic entomology* 113 (4) , pp.1810-1815, 2020.

DUBEY; SINGH; *et al.* **Steering the restoration of degraded agroecosystems during the United Nations Decade on Ecosystem Restoration.** *Journal of environmental management* 280, 2021.

EBADOLLAHI, A. SENDI, J. J. A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests. **Journal of Essential Oil Bearing Plants.** Pá. 146-154. 2015.

EHRlich, P.R. *et al.* Extinction, reduction, stability and increase: the responses of checkerspot butterfly (*Euphydryas*) populations to the California drought. *Oecologia*, v. 46, n. 1, p. 101-105, 1980.

ELLMAN GL, COURTNEY D, ANDRES V, FEATHERSTON RM. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem Pharmacol.* 7: 88-95. 1961.

EMBRAPA, **Criação de abelhas (apicultura).** Embrapa Informação Tecnológica Brasília, DF 2007.

ELMI, A. *et al.* Antimicrobial capabilities of non-spermicidal concentrations of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on the liquid phase of refrigerated swine seminal doses. **Research in veterinary science**, v. 127, p. 76-81, 2019

EMBRAPA ALGODÃO, **Predadores e Parasitóides Chaves e Seletividade de Inseticidas na Cultura Algodoeira.** ed. 1. doc. 209. ISSN 0103-0205. Campina Grande, PB. 2008.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, **Relatório aponta a importância da polinização para a agricultura brasileira.** Biodiversidade Estudos socioeconômicos e ambientais. 2019. Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41144724/relatorio-aponta-a-importancia-da-polinizacao-para-a-agricultura-brasileira> acesso: 18/06/22 as 17:10

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Inseticidas botânicos: uma nova visão para um velho problema.** Notícia, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4439225/inseticidas-botanicos-uma-nova-visao-para-um-velho-problema> acesso em 29/05/2022 às 19:50

ERDEMIR E ERLER. Repellent, oviposition-deterrent and egg-hatching inhibitory effects of some plant essential oils against citrus mealybug, *Planococcus citri* Risso (Hemiptera: Pseudococcidae). *J Plant Dis Prot* 124, 473–479 2017.

ERTEKIN, T. *et al.* The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. **Folia morphologica**, v. 78, n. 2, p. 307-313, 2019.

Expedição vida. **Como acontece a formação dos pintinhos nos ovos?** 28 de janeiro de 2014. Disponível em: <http://expedicaovida.com.br/como-acontece-a-formacao-dos-pintinhos-nos-ovos-fotos-chocantes/>. Acesso em: 018/01/2022 as 15:27.

FARHAT, A. *et al.* In Ovo effects of two organophosphate flame retardants -TCPP and TDCPP- on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos. *Toxicological sciences*, v. 134, n. 1, p. 92–102, 2013.

FEIDEN, **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável.** Agroecologia: Introdução e Conceitos. Embrapa Informação Tecnológica p.61, Brasília, DF, 2005.

FERNANDO, *et al.*, O setor do agronegócio em rio verde/go: lucros e aumento do uso de agrotóxicos em tempo de pandemia. *Revista Mutirão (Recife)* V. II, No. II, 2021.

FEUERBACHER; *et al.*, Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on fluctuating metabolic rate and mechanical power in the bee *Apis mellifera* (Artigo). **Revista de Biologia Experimental.** V. 206, Ed. 11, Pg. 1855-1865, Junho de 2003.

FIORE; NUZZO; *et al.* Honeybees as Bioindicators of Heavy Metal Pollution in Urban and Rural Areas in the South of Italy. *Atmosfera*13 (4), abril 2022.

FLENTKE E SMITH. **The avian embryo as a model for fetal alcohol spectrum disorder.** *Biochemistry and cell biology* 96 (2), pp.98-106. Apr. 2018.

FREYMUELLER; *et al.*. Uma análise dos impactos dos eventos anóxicos oceânicos do Cretáceo na dinâmica global da diversidade de moluscos. *Paleobiology*, 45 (2), 280-295. 2019. doi:10.1017/pab.2019.10

GAROZZO, A. *et al.* In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 6, p. 806-808, 2009.

GARCIA CC, *et al.* Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações de sabonete líquido íntimo acrescidas de óleo de Melaleuca. *Rev Bras Farm*, 2009

GILL; SETHI; *et al.* **Glyphosate toxicity for animals.** *Environmental chemistry letters* 16 (2) , pp.401-426. 2018.

GODOY; *et al.*, Seletividade fisiológica de inseticidas em duas espécies de crisopídeos. **Entomologia.** *Pesq. agropec. Bras.* 45 (11), pp. 1253-1258. Nov 2010 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100004>

GOMES, I. N. Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* E *Apis mellifera*. Florestal minas gerais – brasil 2017.

GOMES, A. R. *et al.* Insights about the toxicity of tannery effluent on chicken (*Gallus gallus domesticus*) embryos. **Chemosphere**, v. 244, p. 125403, 2020.

GROTZNER, S. R. Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia. Editora Santos, p. 237–294, 2012.

GUSTAFSON, J.E. *et al.* Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p.194-8, 1998.

HART, P. H. *et al.* Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, n. 11, p. 619-626, 2000.

HUGHES; MALONEY e BEJARANO. **São Vertebrados Ainda Necessário na Rotina de Efluentes Inteiros Toxicidade Testes para Descargas de Petróleo e Gás?**. *Revista de ciência ambiental e saúde parte b-pesticidas contaminantes de alimentos e resíduos agrícolas*55 (1), pp.75-89, 2020.

HYBL; BOHATA, *et al.* **Evaluating the Efficacy of 30 Different Essential Oils against Varroa destructor and Honey Bee Workers (*Apis mellifera*).** *INSECTS* 12 (11), 2021.

HADDI; *et al.* Repensando os inseticidas bioracionais para o manejo: efeitos e consêquências não intencionais. *Ciência de Manejo de Pragas* 76, 2286 -2293. 2020.

HAMBURGER; HAMILTON. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 1951.

HEID, S. E.; WALKER, M. K.; SWANSON, H. I. Correlation of cardiotoxicity mediated by halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicological sciences*, v. 61, n. 1, p. 187–196, 2001.

HEDTKE, S.M. *et al.* Introduction of non-native pollinators can lead to trans-continental movement of bee-associated fungi. *PLoS ONE* v. 10, n. 6, 2015.

IMPERATRIZ-FONSECA E JOLY. **Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global.** *Avaliação Polinizadores, Polinização e Produção de Alimentos da*

Plataforma Intergovernamental de Biodiversidade e Serviços de Ecossistemas (IPBES). Cap. 1. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). 124p. DF, 2017.

IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, Bees, ecosystem services and the Brazilian Forest Code, Rev. Scielo. **Artigos** Biota Neotrop. 10 (4), Dez 2010 <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400008>

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *et al.* Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012a.

ISMAN, M. B. GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**. V. 19. Pag. 140-145. 2014.

ISMAN. Pesticides Based on Plant Essential Oils: Phytochemical and Practical Considerations. **Culturas Medicinais e Aromáticas: Produção, Fitoquímica e Utilização: ACS Publications**; Chapter 2pp 13-26. Vol. 1218. DOI: 10.1021/bk-2016-1218.ch002. 2016.

ISMAN. Óleos essenciais vegetais para o manejo de pragas e doenças Prot., 19, págs. 603-608. 2000.

ISMAN. Inseticidas botânicos, dissuasores e repelentes na agricultura moderna e em um mundo cada vez mais regulamentado. Anu. Rev. Entomol. , 51 , pp. 45-66 , 10.1146, 2006.

ISMAN, M. B. TAK, J. H. Inibição da acetilcolinesterase por óleos essenciais e monoterpenóides: um modo de ação relevante para óleos essenciais inseticidas? **Indust Crops Prod**. V. 13. Pág 71-78.2017.

ISMAN. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochem Rev* 19, 741. 2020.

IFOP. **Controle Biológico: o que é, para que serve e quais os tipos**. Artigos, Concursos Agrônomos, Ifop educacional, 2018.

ITURBE-REQUENA SL, *et al.* Toxic effects of new ethyl-carbamates on the morphology, mortality and acetylcholinesterase activity of *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 176:219–225. 2020.

IZADI, H. SARNEVESHT, M. SADEGHI, R. MAHDIAN, K. JALAI, MA. Efeitos tóxicos de piriproxifeno, neemarin, acetamiprid e óleo essencial de *Ferula assafoetida* no pistache psylla comum, agonoscaena pistaciae. **Arco. fitopatol. Plant Prot**. 2012.

JOHANSEN E MAYER, 1990. JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. Pollinator protection. A bee pesticide handbook. Cheshire, USA: Wicwas Press, 1990.

JUNG, A. MACHADO, M. R. R. STEFANELO, L. S. TASCHELO, R. GUEDES, J. C. Horários de forrageamento de *Apis mellifera* L. em soja e riscos de contaminação com pesticidas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 4, 14 fev. 2020.

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

KLEIN *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KOCH, M. S. *et al.* Aspectos gerais da Mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: Uma breve revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, 2021.

KOHL, A. *et al.* A proof-of-concept study demonstrating that environmental levels of carbamazepine impair early stages of chick embryonic development. **Environment international**, v. 129, p. 583-594, 2019.

KUBIAK; *et al.*. Chorioallantoic Membrane Models of Various Avian Species: Differences and Applications. **Diários Biologia** Volume 10 Edição 4. 2021

KUMAR, *et al.*, Revisão Detalhada sobre Toxicidade de Pesticidas para Abelhas e seu Manejo. **Apicultura Moderna** - Bases para a Produção Sustentável. Cap. 2, Ebook 978-1-78985-493-0. Pag. 202. DOI10.5772/intechopen.82888. 2020

KUMAR, PS. The influence of *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia*, and *Cocos nucifera* on *Candida albicans* strain in tissue conditioner at varying time intervals. **Journal of indian prosthodontic society** 20 (2), pp.171-179. April, 2020. DOI: 10.4103/jips.jips_366_19

LANTU XIONG, *et al.* Microemulsification of nonvolatile components of *Melaleuca alternifolia* and borneol can effectively defend *Rhizoctonia solani*. **Industrial Crops and Products** Vol. 184, 15, 115052 September 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115052>

LAO, O. B. *et al.* Outcomes in neonates with gastroschisis in US children's hospitals. **American journal of perinatology**, v. 27, n. 01, p. 097-101, 2010.

LEONARDI; BERNARDO. **Essential oils as a sustainable alternative to agricultural production: a literature review**. Cadernos Agroecologia – ISSN 2236-7934 - Anais do 1º Congresso Online Internacional de Sementes Crioulas e Agrobiodiversidade - Dourados, Mato Grosso do Sul- v. 15, nº. 4, abril, 2020.

LIBARDONI, G. ; NEVES, P. M. J. O. ; ABATI, R. ; SAMPAIO, A. R. ; COSTA-MAIA, F. M. ; VISMARA, E. ; LOZANO, E. R. ; POTRICH, M. . Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports** , v. 11, p. 1-9, 2021.

LINA, *et al.*, Botanical insecticide nanoemulsion of *Piper Aduncum* extract to control Cabbage Head Cartepillar *Crociodomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). IOP Conf. Series: Earth and **Environmental Science** 583 (2020) 012023. 2020

LIAO; YANG, *et al.*, Toxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil to the mitochondrion and NAD(+)/NADH dehydrogenase in *Tribolium confusum*. **Bioquímica, biofísica e biologia molecular**. 2018.

LIAO, M. *et al.* Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167748, 2016.

LOBO, A. P. CÂMARA, C. A. G. MELO, J. P. R. MORAES, M. M. Composição química e atividade repelente dos óleos essenciais das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* e *Eugenia uniflora* contra *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae). **J. Plant Dis. Prot.** pp. 79-87. 2019.

LOPES E ALBUQUERQUE, **Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review**. Saúde Debate, RIO DE JANEIRO, V. 42, N. 117, P. 518-534, ABR-JUN 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/bGBYRZvVVKMrV4yzqfwwKtP/?lang=pt&format=pdf> em: 24/05/2022 às 18:07.

LIU, X. *et al.* Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 2, p. 247-253, 2009.

LYNN, *et al.* Effect of Azadiractin and Neem based Formulations for the Control of Sweetpotato Whitefly and Nematode Root knots. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2010.

MACIEL; BARBOSA E PREZOTO. Physiological selectivity and tolerance of social wasps exposed to Malathion. **Environmental Pollution**. Vol. 315, 120339. 15 December 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120339>

MALUF, S. **Aromaterapia**. São Paulo: [s.n.] 2009

MARTEN, G. C. Productivity, Stability, Sustainability, Equitability and Autonomy as Properties for Agroecosystem Assessment. *Agricultural Systems*.1988.

MENTEN. *Produtos fitossanitários biológicos*. *AgroLink*, **14042** acessos, 2017. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/colunistas/produtosfitossanitariosbiologicos_388592.html acesso em: 13 de novembro de 2019 as 15:47.

MARTINEZ, K. [**Agricultura tóxica: um olhar sobre o modelo agrícola brasileiro**, [temos um abacaxi para descascar, Greenpeace, Rua Fradique Coutinho, 352 Pinheiros - São Paulo/SP CEP 05416-000 - Brasil, 2017.

MATOS; SANTOS, *et al.* **Potential source of ecofriendly insecticides: Essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory**. *Ecotoxicology and environmental safety* 209. 2021

MATOS; *et al.*, Potential source of ecofriendly insecticides: Essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 209, 111764, February 2021, <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ecoenv.2020.111764>

MCKERNAN, M. A. *et al.* Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (de-71) in chicken (*Gallus gallus*), mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchlings. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 28, n. 5, p. 1007-1017, 2009.

MATHUR, P. *et al.* Insecticide Marshal® EC induces teratological changes in the embryos of *Gallus domesticus*. **Int J Pharm Bio Sci**, v. 4, n. 1, p. 267, 2013.

MELO; PICANCO, *et al.* **Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species**. *CROP PROTECTION* 104 , pp.47-51. 2018.

MILLS, L. S. *et al.* The keystone-species concept in ecology and conservation. *BioScience*, v. 43, n. 4, p. 219-224, 1993.

MILLS; *et al.*, Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Volume 56, Issue 3, March 2004, Pages 375–379, 2010. <https://doi.org/10.1211/0022357022773>

MIRANDA, J. R. Avaliação da biodiversidade faunística em agroecossistemas de cana-de-açúcar orgânica. *Bioikos*, Campinas, 20(1):15-23, 2006.

MOLINA, E. D. *et al.* Effects of air cell injection of perfluorooctane sulfonate before incubation on development of the white leghorn chicken (*Gallus domesticus*) embryo. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 1, p. 227-232, 2006.

MORITZ; ERLER. Colônias perdidas encontradas em uma mina de dados: Comércio global de mel, mas não pragas ou pesticidas como uma das principais causas do declínio regional de colônias de abelhas. *Agrícola. Ecosist. Ambiente*. 2016

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MONTERO-MENDEIETA; TAN; *et al.*, **The genomic basis of adaptation to high-altitude habitats in the eastern honey bee (*Apis cerana*)**. *MOLECULAR ECOLOGY* 28 (4) , pp.746-760. 2019

NASCIMENTO; GOMES; BATISTA; FREITAS. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. **Hortic. bras.**, v. 30, n. 3, jul. - set. 2012.

NAZARI; MULLER. **Erros do desenvolvimento**. Embriologia humana. BIOLOGIA/EAD/UFSC. 170 pg. CDU: 611-013. Florianópolis, 2011.

NOCELLI; *et al.*, **Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas**. Embrapa. 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf> acesso em: 24/01/2022 as 18:55.

NUNES-SILVA, P. *et al.* Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie* n. 44, p. 537–546. 2013.

NITU; *et al.*, Teratogenic and biochemical effects of a formulation containing dicofol in the chick embryo. *Química Toxicológica e Ambiental*, **Vol. 94, Ed. 7, 2012**. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1080/02772248.2012.705287>

O'BRIEN, R. D. **Toxic phosphorus esters** New York: Academic, 1960. 434 p.

OLIVA, B. *et al.* Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in applied microbiology**, v. 37, n. 2, p. 185-187, 2003.

OLIVEIRA; FONTANA *et al.* Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev Bras PI Med*. 2011.

OLIVEIRA; NASCIMENTO, *et al.*, **Spraying Hatching Eggs with Clove Essential Oil Does Not Compromise the Quality of Embryos and One-Day-Old Chicks or Broiler Performance**. *ANIMALS* 11 (7). 2021

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. **How many flowering plants are pollinated by animals?** *Oikos*, v. 120, p. 321-326, 2011.

ORTOLANI-MACHADO, C. F. *et al.* **Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas**. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; 2012.

OSTIGUY, N. *et al.* Exposição de abelhas a pesticidas: um estudo nacional de quatro anos. *Insetos* , v. 10, n. 1, pág. 13, 8 jan. 2019.

PAIVA; *et al.* Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*). *Ciência Rural*, v. 33, n. 6, p. 1135-1139, 2003.

PAPA; MAIER; *et al.*. **The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health**. *BIOLOGY-BASEL* 11 (2). Feb. 2022.

PARDINI, R. *et al.* **Levantamento rápido de mamíferos terrestres de médio e grande porte**. In: RUDRAN, R. *et al.* *Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre*. 2 ed. Curitiba: UFPR. p.181-202. 2006.

PAREKH; DAUGHENBAUGH, e FLENNIKEN. **Chemical Stimulants and Stressors Impact the Outcome of Virus Infection and Immune Gene Expression in Honey Bees (*Apis mellifera*)**. *Frente. Immunol. Sec. Comparative Immunology* 28 de outubro de 2021

PARWEEN; RAMANATHAN; *et al.*. **Assessment of toxicity and potential health risk from persistent pesticides and heavy metals along the Delhi stretch of river Yamuna**. *ENVIRONMENTAL RESEARCH* 202, nov, 2021.

PAVELA, R. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. **Parasitology Research** v. 114, pages3835–3853. 2015.

PAVELA, R. BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**. V. 21, Issue 12, December 2016.

PAULINO; *et al.* **Óleos essenciais no controle alternativo da antracnose em hortaliças e frutíferas.** v. 13 n. 1 Anais do VI Congresso Latino-americano de Agroecologia; X Congresso Brasileiro de Agroecologia; V Seminário de Agroecologia do Distrito Federal e Entorno; 12 a 15 de setembro de 2017, Brasília/DF 2018.

PEREIRA, T. S. *et al.* In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 852-857, 2014.

PEREIRA, R. B. *et al.* **Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, Fevereiro, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000100014&lng=en&nrm=iso. Acesso 29/01/2022

PÉREZ-ROSÉS, R. *et al.* Antioxidant activity of Tween-20 and Tween-80 evaluated through different in-vitro tests. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 666-672, 2015.

PETERS, Essential Oils – Historical significance, chemical composition and medicinal uses and benefits. Nova Science Pluishers, new York, 2016.

PIMENTEL; *et al.* **Custos ambientais e econômicos do uso de pesticidas** BioScience , 42 , pp . 750-760, 1992.

PINHEIRO; LUZ, *et al.* **Effects of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oils on the honey bees *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera) foraging.** REVISTA DE CIENCIAS AGRICOLAS 36 (E) , pp.31-41. Jun-dec 2019

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 266-281, 2010. R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RAHMAN, M. Ar. Movement of chick embryo (*Gallus domesticus* L.) towards the blunt end of the egg in relation to shell pore density and air cell size. **Rajshahi University Zoological Society**, v. 34, p. 7-13, 2015,

RAYMANN; *et al.* **Imidacloprid Decreases Honey Bee Survival Rates but Does Not Affect the Gut Microbiome.** ASM Journals, Applied and Environmental Microbiology Vol. 84, No. 13, June. 2018.

REGNAULT-ROGER, C. VINCENT, C. ARNASON, JT. Óleos essenciais no controle de insetos: produtos de baixo risco em um mundo de alto risco. **ANNU. VER. ENTOMOL.** Pag. 405-424. 2012.

RIBEIRO; FARIAS, *et al.*, **Selection of an essential oil from *Corymbia* and *Eucalyptus* plants against *Ascia monuste* and its selectivity to two non-target organisms.** CROP PROTECTION 110 , pp.207-213. 2018

RIPPER, W. E.; GREENSLADE, R. M.; HARTLEY, G. S. Selective insecticides and biological control. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 44, p. 448-459, 1951.

ROCHA, M. S.; DELGADO, S. E. Speech language therapy in a preterm newborn infant with gastroschisis. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 12, p. 55-62, 2007.

RODRIGUES, E.; PRIMACK, R. **Biologia da conservação.** Londrina: Planta, 2001.

RODRIGUES, L. Mamíferos de médio e grande porte em um agroecossistema na região do Alto Paranaíba, MG, Brasil. Bambuí-MG, 2019.

ROONGRUANGCHAI, J. *et al.* The teratogenic effects of monosodium glutamate (MSG) on the development of chick embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 6, p. 514-522, 2018.

SADLER, T. W.; FELDKAMP, M. L. The embryology of body wall closure: relevance to gastroschisis and other ventral body wall defects. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2008. p. 180-185.

SALVAGGIO, A. *et al.* Teratogenic effects of the neonicotinoid thiacloprid on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 812-820, 2018.

SAMPAIO, a. R. Universidade tecnológica federal do paraná programa de p s-gradua o em agroecossistemas meta-análise de agrotóxicos em *apis mellifera* l . Em forrageiras africanizadas e soja meta-análise de agrotóxicos em *apis mellifera* l . Em forrageiras africanizadas e. 2020.

SANTOS; WANDERLEY-TEIXEIRA; *et al.* **Essential oil toxicity on biological and reproductive parameters of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae)**. Acta Histochemica Volume 123, Issue 4, maio de 2021.

SAMPAIO, A. R. Análise de agrotóxicos e Acibenzolar-S-Met lico (ASM) em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e a año de ASM na indu o de resistência em soja. Disserta o (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

SCHMID-HEMPEL, R. *et al.* The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. J. Anim. Ecol. n. 83, p. 823-837. 2014.

SCHOENWOLF, G. C. **The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology**. In: MOODY, S. A. Cell lineage and fate determination. San Diego: Academic Press, 644p, 1999.

SEFCIKOVA; BABEL'OVA; *et al.* **Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos**. TOXICOLOGY 410 , pp.214-221, 2018.

SIMONE-FINSTROM; ARONSTEIN; *et al.*, **A irradia o gama inativa o melabelhapat genos e parasitas fúngicos, microsporidianos e virais**. Revista de patologia de invertebrados153 , pp. 57-64, 2018.

SIEBERT; KANGA; BASHA; LEGASPI. Molecular Assessment of Genes Linked to Immune Response Traits of Honey Bees in Conventional and Organically Managed Apiaries. *Insects*. 2020

SIENKIEWICZ *et al.* **Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils**. Int Rev Allergol Clin Immunol, v. 17, p. 40-44, 2011.

SILVA; RADAESKI; *et al.*, **Atlas de polens e plantas usados por abelhas**. pg.108, 1^a Edi o Sorocaba-SP, 2020

SILVA; RAGA. Uso De Extratos Naturais No Controle De Insetos, Com  nfase Em Moscas-Das-Frutas (Diptera: Tephritidae) Biológico, São Paulo, v.81, n. 1, p.1-30, 2019.

SIMÕES, R. P. *et al.* Efeitos do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infec o estafilocócica. Lecta, Bragan a Paulista, v. 20, n. 2, p. 147-152, 2002.

SHARP, A. A.; FEDOROVICH, Y. Teratogenic effects of pyridoxine on the spinal cord and dorsal root ganglia of embryonic chickens. Neuroscience, v. 289, n. 4, p. 233– 241, 2015.

SHARMA; *et al.*, A combination insecticide at sub-lethal dose debilitated the expression pattern of crucial signalling molecules that facilitate craniofacial patterning in domestic chick *Gallus domesticus*. **Neurotoxicology and Teratology**, Vol. 76, 2019. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ntt.2019.106836>

SHELTON; *et al.* Isolamento de genes envolvidos no metabolismo secund rio de *Melaleuca alternifolia* (Cheel) usando marcadores de sequência expressa (ESTs). **Plant Science** , v. 162, n. 1, p g. 9-15, 2002.

SOARES; OLIVEIRA, *et al.*, Tetracycline Exposure Alters Key Gut Microbiota in Africanized Honey Bees (*Apis mellifera scutellata* x spp.). *Front. Ecol. Evol.*, 29 September, 2021.

SOUZA; *et al.* Serviços ecológicos de insetos e outros artrópodes em sistemas agroflorestais. Ano 10, Vol XX, Número 1, Pág. 22 -35, Jan-Jun, 2018.

SOUZA, C. F. *et al.* *Melaleuca alternifolia* essential oil abrogates hepatic oxidative damage in silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed with an aflatoxin-contaminated diet. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 221, p. 10-20, 2019.

STEFFEN, Controle de *sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp. Com óleo essencial de melaleuca, 2019.

STENFER, L. D. LIBARDONI, G. JÚNIOR, A. W. ZANELA, J. ALVES, T. L. VARPERCHOSKI, G. O. LOZANO, E. R. POTRICH, M. Essential oils in pathogen resistance induction of *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **FORESTRY SCIENCE**. *Cienc. Rural* 51 (9). 2021.

STENGER; *et al.* Toxicity of essential oil of *Eugenia uniflora* (L.) to *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) and selectivity to the parasitoid *Cleruchoides noackae* (Lin & Hubert) (Hymenoptera: Mymaridae). *CROP PROTECTION* , v. 147, p. 105693, 2021.

SUTENDRA, G.; MICHELAKIS, E. D. The chicken embryo as a model for ductus arteriosus developmental biology: cracking into new territory. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R481-R484, 2007.

TALUKDAR; LANGTHASA; *et al.*, **Smokeless tobacco 'sadagura' and areca nut extract exposure induces extensive embryotoxicity in chick embryo, *Gallus gallus domesticus***. *TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES* 12 (1) , pp.55-63. 2020

TAVERNARI e MENDES, Desenvolvimento, crescimento e características do sistema digestório de aves. Art. Nº 101, Revista Eletrônica Nutritime, v.6, nº6, p.1103-1115 Novembro/Dezembro, 2009.

THERNEAU, T. A Package for Survival Analysis in S. Version 2.38, 2015.

TOMÉ, H.V.V.; MARTINS, G.F., LIMA, M.A.P.; CAMPOS, L.A.O.; GUEDES, R.N.C.. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE*. 7(6): e38406. 2012.

TOMÉ, H. V. V *et al.* Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species : impact on survival and activity. *Annals of Applied Biology*, v. 167, p. 186–196, 2015.

TOMÉ, H. V. V. SCHMEHL, D. R. WEDDW, A. E. GODOY, R. S. M. RAVAIANO, S. V. GUEDES R. N. C. MARTINS, F. G. ELLIS, J. D. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**. V. 256. 2020.

TURGUT, U. *et al.* Valproic acid effect on neural tube defects is not prevented by concomitant folic acid supplementation: Early chick embryo model pilot study. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 78, p. 45-48, 2019.

ULLAH; GAJGER, *et al.*, **Impactos virais nas populações de abelhas: uma revisão**. **Saudi journal of Biological Sciences**. Volume 28, Issue 1, Páginas 523-530, janeiro de 2021.

UMUR, A. S. *et al.* Simultaneous folate intake may prevent adverse effect of valproic acid on neurologic nervous system. **Child's Nervous System**, v. 28, n. 5, p. 729-737, 2012.

VAN, A. A. J.; LEITJEN, G. C. J. J. **Essential Oils and Oleoresins: A survey in The Netherlands and other Major Markets in The European Union**. CBI, Centre for the Promotion of Imports for Developing Countries, Rotterdam, 116 p., 1999.

VANCAMP, P.; DARRAS, V. M. Dissecting the role of regulators of thyroid hormone availability in early brain development: Merits and potential of the chicken embryo model. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 459, p. 71-78, 2017.

VELOSO, R. J. *et al.* **Potential of thyme essential oil on arugula sanitization.** **Agricultural Sciences** • Ciênc. agrotec. 43, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/f69MRxXJXxbZcv9d9T9rBS/?lang=en> . Acesso em: 30/01/2022 as 22:49.

VIEIRA, J. E. A. *et al.* An insight on the mutagenicity and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae). **Chemosphere**, v. 231, p. 10-19, 2019.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**. Pag. 390 – 400. 2003.

VIANA; *et al.* Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. *Journal of Health & Biological Sciences*. Capa > v. 6, n. 4, 2018.

VILLA; VIGHI; *et al.* Avaliação de risco para abelhas de pólen exposto a pesticidas. **Ecotoxicologia** **9**, 287-297, 2000. <https://doi.org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1023/A:1026522112328>

WITTER; *et al.*, As abelhas e a agricultura. **Abelhas como polinizadoras**. Ed. EDIPUCRS, CDD 574.524. Porto Alegre, 2014 Modo de Acesso: ISBN 978-85-397-0658-7

World Bank. **Agricultural land (% of land area)**. 2018. Disponível em: <https://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.AGRI.ZS?end=2016&locations=BR&start=1961&view=chart> Acesso em: 19/01/2022 as 20:10.

WRATTEN *et al.* Pollinator habitat enhancement: Benefits to other ecosystem services. *Agriculture, Agrosystems and Environmental*, v. 159, p. 112-122, 2012.

YAGHOBI-ERSHADI; *et al.*, Repellency effect of myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. **Iranian Journal Of Public Health**. Vol.35, Ed.3, Pg.7-13, 2006. <https://orcid.org/0000-0002-5983-9420>

YAMAMOTO, F. O.; NETO, F. F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmiu meffect sone arly develop ment of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

WANG, W. *et al.* Dual effects of Tween 80 on protein stability. **International journal of pharmaceutics**, v. 347, n. 1-2, p. 31-38, 2008.

WEI WANG *et al.* Dual effects of Tween 80 on protein stability. **International Journal of Pharmaceutics** Vol. 347, Issues 1–2, 22, Pg. 31-38. January 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.042>.

ZANDI-SOHANI; *et al.*, Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) Against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology** Vol.42 (1), Pp.89-94, 2013. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13744-012-0087-z>

ZANDI-SOHANI & RAMEZANI. **Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestanii* Ugarov and Nikolskii.** *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol. 98, Pages 101-106, março 2015.

ZARIC; DELJANIN *et al.* **Assessment of spatial and temporal variations in trace element concentrations using honeybees (*Apis mellifera*) as bioindicators.** *PEERJ* 6, 2018.

ZHANG, X. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

ZHU, J.Y., FU, Y., NETTLETON, M., RICHMAN, A., HAN, Z. **High throughput in vivo functional validation of candidate congenital heart disease genes in Drosophila**. *E Life* 6: e22617. 2017.

ZIMMERMANN, R. C. *et al.* Insecticide activity and toxicity of essential oils against two stored-product insects. **Crop Protection**, v. 144, p. 105575, 1 jun. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105575>