

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

CLAUDIA CRISTINA ROSSONI

**TOXICOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (*Cymbopogon*
sp.) E GUAÇATONGA (*Casearia sylvestris* Swartz) EM EMBRIÃO DE
GALINHA (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2019

CLAUDIA CRISTINA ROSSONI

**TOXICOLOGIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (*Cymbopogon*
sp.) E GUAÇATONGA (*Casearia sylvestris* Swartz) EM EMBRIÃO DE
GALINHA (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso Superior em Ciências Biológicas –
Licenciatura, da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos,
como requisito parcial para obtenção do título de
Bióloga Licenciada.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Patrícia Franchi
Freitas

DOIS VIZINHOS

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº ____

**Toxicologia dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon sp*) e
guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em embrião de galinha (*Gallus
gallus domesticus* Linnaeus)**

Claudia Cristina Rossoni

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 15 horas e 00 minutos do dia 12 de junho de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Michele Potrich
UTFPR - DV

Prof. Patricia Franchi Freitas
Orientadora
UTFPR – DV

Prof. Sérgio Miguel Mazaró
UTFPR - DV

Profa. Marcele Felippi
Coordenadora do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – DV

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me abençoou e me permitiu chegar até aqui debaixo da sua graça. Agradeço a meu esposo, Antonio que me apoiou e me incentivou em todos os momentos.

A minha filha, Maria Eduarda que ficou sem a mamãe por muitas noites, e que se comportou muito bem.

A minha mãe Noely que me ajudou muito, e que sem a sua ajuda eu não teria conseguido dar conta de tantos afazeres.

Ao meu pai, que sempre me incentivou e me cobrou que eu estudasse para ter um futuro melhor. Agradeço também a minha irmã Gabrieli, que sempre esteve ao meu lado.

Grata a minha orientadora, prof. Patrícia, que me ajudou muito com seu conhecimento e carisma. A professora Lilian que esteve presente em todos os experimentos.

Grata por fazer parte do grupo GEET (Grupo de Estudos em Embriotoxicologia e Teratologia) da UTFPR-DV. As minhas colegas de experimento: Jéssica e Silvane por todo o companheirismo.

Agradeço as minhas amigas, Jéssica, Fabiane, Thainá e Vanessa. Obrigada pelo companheirismo e amizade. Enfrentamos muitos desafios e vencemos juntas! Vocês sempre estarão em meu coração!

Muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Cury)

RESUMO

ROSSONI, Claudia Cristina. Análise toxicológica dos óleos essenciais de Citronela (*Cymbopogon sp*) e Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus). 2019, 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

No presente trabalho, buscou-se analisar os efeitos dos óleos essenciais de Citronela (*Cymbopogon sp*) e Guaçatonga (*Casearia sylvestris*), comparando com os efeitos do fungicida a base de iprodiona sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, DV. Cada grupo experimental (com 40 ovos) recebeu as seguintes concentrações: grupo controle veículo (1) recebeu 100µl de solução Tween[®]80 a 0,01% em água destilada e o grupo controle veículo (2) recebeu 100µl de Tween[®] 80 a 1% em soro fisiológico, os grupos com óleos essenciais de citronela e guaçatonga receberam 100µl, sendo 62,5 µg/ml e 4.000µg/ml, respectivamente, em água destilada. Por fim, no grupo com produto fitossanitário sintético, os ovos foram injetados com 100µl do fungicida a base de Iprodiona em água destilada (na dose recomendada pelo fabricante). O grupo controle fechado não foi injetado. Tais doses foram injetadas na câmara de ar dos ovos, e estes foram incubados por 3 dias. Após a incubação os embriões foram coletados e analisados. Dentre os tratamentos, os OEs e o produto fitossanitário apresentaram toxicidade ao desenvolvimento do embrião de ave, porém, o produto fitossanitário foi o que causou maiores danos aos embriões. O grupo controle fechado apresentou resultados dentro do esperado. Ambos os tratamentos com Tween[®]80 provocaram efeitos deletérios sobre o desenvolvimento, interessante o Tween[®]80 em menor concentração provocou efeitos mais nocivos. Tais resultados nos alertam sobre os efeitos que os OEs podem causar, bem como o produto fitossanitário e interessante o Tween[®]80. Estes dados buscam contribuir no conhecimento da biosegurança de agentes de controle importantes para os sistemas alternativos de produção, visando a utilização de produtos naturais e seguros ao meio ambiente e saúde humana.

Palavras-chave: Organismo não-alvo. Seletividade. Biossegurança.

ABSTRACT

ROSSONI, Claudia Cristina. Toxicological analysis of Citronella (*Cymbopogon sp*) and Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) essential oils in chicken embryos (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus). 2019, 37 p. Undergraduate thesis (Graduation in Biological Sciences), Universidad Technological Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

The present work sought to analyze the effects of Citronella (*Cymbopogon sp*) and Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) essential oils comparing with effects of the iprodione-based product on the embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. The experiments were carried out at the Biological Control Laboratory II at Universidad Technological Federal do Paraná – UTFPR, DV. Each experimental group (containing forty eggs) received the following concentrations: vehicle control group (1) received 100µl of 80 to 1% Tween® in distilled water and the vehicle control group (2) received 100µl of 80 to 1% Tween® in saline, the groups with essential oils of Citronella and Guaçatonga received 100µl, being 62,5µg/ml and 4.000 µg/ml, respectively, in distilled water. Lastly, the group containing synthetic phytosanitary product, the eggs were injected with 100µl of Iprodione-based fungicide in distilled water (at the recommended dose by the manufacture). Such doses were injected into the egg air chamber and were incubated for three days. After incubation, the embryos were collected and analyzed. Among the treatments, the EOs and the phytosanitary product presented toxicity to the embryos development, however, the product caused more damaged to the embryos. The closed control group presented results within the expected. Both treatments with Tween® 80 caused deleterious effects on the development; interestingly, the Tween® with lower concentration caused more harmful effects. Such results alert us about the effects EOs can cause, as week as the phytosanitary product and interestingly, the Tween®80. These data seek to contribute to the safety knowledge of important control agents for alternative production systems, aiming at the use of natural and safe products to the environment and human health.

Key words: Non-target organism. Selectivity. Biosafety.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Agricultura no Brasil	11
2.2 Produtos Fitossanitários Sintéticos no Brasil	11
2.3 Controle alternativo de fitopatógenos	13
2.4 Óleos essenciais	14
2.5 Citronela (<i>Cymbopogon sp</i>)	14
2.6 Guaçatonga (<i>Casearia sylvestris Swartz</i>)	15
3.0 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO PARA ESTUDOS DE EMBRIOTOXICOLOGIA E TERATOLOGIA	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Modelo biológico e desenho experimental	17
4.2 Método de exposição	18
4.3 Análise morfológica	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção agrícola no Brasil, houve a necessidade da utilização de insumos modernos, como fertilizantes para correção do solo e recuperação de áreas degradadas (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008). Da mesma forma que os insumos, houve um aumento no uso das tecnologias, como maquinários mais modernos, produtos fitossanitários, melhoramento genético, entre outros (SHIMABUKURO&MARTINEZ, 2017). Um problema enfrentado com o aumento da produção agrícola e um dos maiores causadores de impactos ambientais é o uso excessivo de fertilizantes e produtos fitossanitários sintéticos (PFS), pois podem trazer riscos à saúde pública e meio ambiente, além disso, o uso intensivo dos mesmos tende a gerar a resistência dos organismos alvo, causando o surgimento de novas pragas danosas à agricultura (TERRA, p.30-31, 2008). No entanto, nos últimos anos o controle com PFS vem demonstrando perda de sua eficiência, devendo ser utilizado com cautela, pois podem eliminar organismos benéficos e selecionar organismos resistentes.

O controle de fitopatógenos não precisa ser realizado exclusivamente com PFS, pois existem alternativas naturais de controle, como a utilização de óleos essenciais extraídos de plantas, já que as mesmas são fontes naturais de substâncias que podem ser produzidas em resposta a um ataque patogênico. Ainda que os óleos essenciais sejam substâncias produzidas de forma natural, sendo mais seguros que os PFS, é importante considerar que eles podem apresentar efeitos negativos aos organismos não-alvo. No entanto, não há registros dos efeitos que os mesmos causam no desenvolvimento embrionário (utilizando o embrião de ave como modelo experimental).

A atividade biológica dos óleos essenciais, dependendo da concentração utilizada, pode atuar como agentes fungistáticos e/ou fungicidas (BRUM; 2012). A hidrofobicidade do óleo essencial interage com os lipídios da parede, membrana celular e da mitocôndria, causando distúrbios como alteração na hipermeabilidade da membrana plasmática (COSTA; et al. 2011). Segundo Schwan-Strada, et al. (2000, p.131) os óleos essenciais têm indicado potencial no controle de fitopatógenos pela sua ação fungitóxica, inibindo o crescimento e a germinação de esporos. Portanto, os

compostos presentes nos óleos essenciais podem ser uma forma eficaz de controle alternativo, enquanto produtos fitossanitários.

Sendo assim, o presente projeto procurou analisar os efeitos dos óleos essenciais de Citronela (*Cymbopogon sp*) e Guaçatonga (*Casearia sylvestris*), em comparação com os efeitos do fungicida sintético a base de iprodiona, no desenvolvimento embrionário de galinha (*Gallus gallus domesticus*). Esse modelo experimental é considerado uma ferramenta valiosa para avaliar os efeitos de substâncias e agentes de controle alternativo (SCHOENWOLF, 1999). Segundo Moore e Persaud (2008), as fases iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e humanos são semelhantes, permitindo relacionar os resultados obtidos aos riscos de exposição humana a estes agentes (BASU et al., 2013; FARHAT et al., 2013; HEID et al., 2001; SHARP & FEDOROVICH, 2015; SOUCY et al., 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agricultura no Brasil

Nas décadas de 1960 e 1970 o setor agrícola no Brasil se caracterizava por baixa produtividade, boa parte dos alimentos para abastecimento interno provinha de importações (EMBRAPA, 2018). Com objetivo de garantir alimento para população urbana em fase crescente, o governo investiu na produção agrícola, o que contribuiu para que o Produto Interno Bruto (PIB) expandisse. Como resultados deste investimento, segundo Embrapa (2018, p.15) “[...] acentuados ganhos de produtividade no setor agrícola puderam ser observados, principalmente a partir da década de 1990”.

Com a expansão da agricultura no Brasil, houve a necessidade da utilização de insumos, como fertilizantes, para recuperação da fertilidade do solo em áreas degradadas, também em áreas onde havia a necessidade de correção do solo para o plantio (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008). O aumento da produção agrícola foi dinamizado pelo uso intenso de tecnologias, como maquinários, genética, agrotóxicos, entre outros (MARTINEZ, 2017). O uso constante de produtos químicos na agricultura pode trazer uma série de problemas ambientais, o excesso de fertilizantes no solo pode ser lixiviado para os rios podendo provocar hipertrofização, da mesma forma que os produtos fitossanitários sintéticos podem causar resistência em fitopatógenos, fazendo com que produtos mais eficientes sejam produzidos.

2.2 Produtos Fitossanitários Sintéticos no Brasil

Apesar da indústria de PFS ter surgido após a Primeira Guerra Mundial, o uso destes produtos se expandiu na Europa e nos Estados Unidos (EUA) somente após a segunda Guerra Mundial. Já no Brasil o uso de PFS ocorreu no período de desenvolvimento da agricultura, entre 1945 e 1985, foi neste período que se estabeleceu a indústria de agrotóxicos no país (TERRA, 2008).

A expansão do mercado de PFS está ligada diretamente ao crescimento da produção agrícola no Brasil. A partir disso, existe uma concorrência na produção, nas vendas e principalmente na qualidade, onde um produto com qualidade inferior não

irá apresentar os resultados esperados. A partir disto quanto mais tóxico for o produto, mais efetividade ele vai ter em relação ao controle de fitopatógenos nas lavouras. Contudo, segundo Terra (2008, p. 30-31) “ousado intensivo de produtos fitossanitários tende a gerar a resistência dos agentes nocivos por eles combatidos e o aparecimento de novas pragas nocivas às culturas agrícolas”. Além disso, o autor salienta sobre os efeitos dos mesmos no meio ambiente e saúde humana, estes fatores só foram identificados dez anos após o uso dos primeiros PFS. Desta forma, as empresas buscam desenvolver novos compostos com efeitos mais específicos e que atingem um número maior de organismos, com efeitos residuais menores e de baixa toxicidade.

A produção e o uso de PFS no Brasil são consolidados pela lei N° 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo decreto N° 4.074/2002, para evitar que PFS de uso proibido sejam utilizados. Essa lei, comumente chamada de “Lei dos Agrotóxicos” determina em seu Art.1° que todas as etapas que envolvem a administração PFS, desde a pesquisa, experimentação, produção até destino final das embalagens, devem obedecer essa lei.

O registro do produto é de extrema importância, pois define se tal pode ser utilizado, a partir disso, são definidas as demais questões relacionadas ao controle do uso, tendo em vista os impactos que podem causar a saúde pública e ao meio ambiente (GARCIA; BUSSACOS; FISCHER, 2005). A lei N° 7.802 no Art.3, §5° destaca que o registro de um novo PFS só será concedido se a sua ação tóxica for igual ou menor do que aqueles já existentes.

Dessa forma, a lei foi elaborada para impedir a utilização e registro de produtos ilegais, visando proteger o meio ambiente e a saúde pública dos efeitos nocivos que eles apresentam, ou pelo menos garantir o mínimo possível de nocividade. Para que a lei possa ser cumprida rigorosamente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável por fiscalização, realiza vigilância nas empresas produtoras de defensivos agrícolas. De acordo com Kugler (2012, p.23) “Operações conduzidas entre 2009 e 2010, em diversos estados, encontraram irregularidades em todas as 10 fábricas de agrotóxicos vistoriadas naquele período”. O consumo de PFS nos últimos anos aumentou 93% no mundo, no Brasil o crescimento foi de 190%, logo, das 50 substâncias aceitas e mais utilizadas no Brasil, 24 já são proibidas no Canadá, Estados Unidos, Europa, e algumas na Ásia (KUGLER, 2012).

Dados mais recentes demonstram o aumento no número de produtos fitossanitários liberados no Brasil. O Ministério da Agricultura publicou no Diário Oficial da União em Janeiro/2019, o registro de 28 produtos fitossanitários e posteriormente publicou um pedido de registro de mais de mais de 131 produtos requeridos nos últimos meses de 2018, estes ainda passarão por avaliações técnicas de três órgãos do governo, entre eles o Sulfoxaflor, um produto que causou polêmica nos estados Unidos (EUA) devido ao impacto potencial sobre polinizadores (GRIGORI, 2019). Vale ressaltar que, o controle químico com PFS apresentam vantagens pela sua eficiência, aumentando a produtividade agrícola, contudo, a utilização contínua e sem rotação de produtos, pode causar eliminação de organismos benéficos e o aumento populacional de fitopatógenos resistentes (SMIDT, 2001, p. 11; MARANGONI; MOURA e GARCIA, 2012, p. 98). Dessa forma, o uso alternado de PFS com agentes de controle natural pode ser uma boa alternativa para amenizar os riscos, reduzindo os impactos nocivos ao meio ambiente em geral.

2.3 Controle alternativo de fitopatógenos

A sociedade tem se preocupado com o impacto que a agricultura moderna pode causar no meio ambiente, isso tem resultado no aumento pela busca de produtos mais sustentáveis, envolvendo a utilização adequada de recursos naturais (CAMPANHOLA E BETTIOL, 2003, p 79). O desenvolvimento de métodos alternativos de controle tem por finalidade diminuir a utilização de PFS na agricultura, causando o mínimo possível de impactos ao meio ambiente, menos desequilíbrios biológicos, com base na sustentabilidade ecológica do ecossistema (SOUSA et al.,2012).

O controle de fitopatógenos é realizado com PFS pelo fato de apresentarem uma maior abrangência e possibilitarem o controle de mais de uma espécie de agentes. Por outro lado, estes produtos são danosos ao meio ambiente e saúde pública, além de matar organismos que são fundamentais para o cultivo, como as abelhas, que fazem a polinização e contribuem para que as plantas se reproduzam, assim sendo, essa alta abrangência nem sempre é positiva (CAMPANHOLA E BETTIOL, 2003, p 81). Logo, o controle de fitopatógenos não precisa ser feito exclusivamente com produtos químicos. Existem alternativas naturais de controle, como o Controle Biológico, um método utilizado para controlar organismos vivos

através de seus inimigos naturais (EMBRAPA, 2006). Outro método alternativo ao controle químico é a utilização de óleos essenciais extraídos de plantas. Segundo (MARANGONI; MOURA e GARCIA, 2012, p. 98) extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje. As plantas são fontes naturais de substâncias produzidas em resposta a um ataque patogênico, alguns inseticidas, antimicrobianos ou até mesmo repelentes. Os sistemas alternativos de controle norteiam os sistemas orgânicos de produção, os quais contribuem para uma interação harmoniosa entre os organismos vivos e o meio ambiente, buscando um equilíbrio ecológico (SAMINÉZ et al, 2008).

2.4 Óleos essenciais

Os OEs são produtos obtidos através de destilação por arraste com vapor d'água, de forma geral, são misturas complexas geralmente líquidas, odoríferas e voláteis que podem ser estocados em todos os órgãos da planta, como folhas, flores, cascas dos caules, frutos, madeira, rizomas, raízes ou sementes, embora sua composição possa variar de acordo com sua localização (LUPE, 2007). Os OEs apresentam funções variadas, podem agir na proteção da planta contra predadores e doenças, sendo assim, a atividade biológica dos compostos secundários presentes nos OEs, podem ser uma forma potencial de controle alternativo (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000; MAZARO et al., 2013). Os benefícios da utilização de OEs no controle alternativo são evidentes e por se tratarem de produtos naturais amenizam os riscos ambientais. Apesar disso, não há registros de pesquisas sobre os efeitos que estes agentes alternativos de controle possuem sobre o desenvolvimento embrionário (utilizando o embrião de ave como modelo experimental).

2.5 Citronela (*Cymbopogon* sp.)

O gênero *Cymbopogon* sp possui cerca de 140 espécies, distribuídas em regiões de clima semi temperado a tropical, sendo plantas herbáceas. Dentre elas, duas espécies principais possuem características farmacêuticas, industriais e cosméticas: *Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon winterianus* (SILVEIRA et al. 2012).

A Citronela é uma planta aromática, caracterizada por possuir propriedades repelentes presentes no óleo extraído de suas folhas, os principais componentes são: citronelal, geraniol e limoneno (COSTA et al., 2008).

2.6 Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw)

Existem duas espécies popularmente conhecidas como Guaçatonga: *Casearia decandra* Jacq. e *Casearia sylvestris* Sw (MATSUSHITA, 2010). Espécie arbórea nativa, popularmente usada como planta medicinal. Suas folhas são utilizadas na forma de chás por possuir propriedades anti-inflamatórias, eficaz contra problemas gástricos e picadas de cobra, além de possuir propriedades antitumorais (SILVA et al., 2008).

Devido às propriedades dos OEs dessas duas espécies, eles foram testados para o controle do mofo cinzento no morango (*Fragaria spp.*), causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, por Vismara (2017). Nesse trabalho foram definidas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) (menor concentração de um agente que inibe substancialmente o crescimento de determinado organismo) dos óleos essenciais de guaçatonga e citronela para o fungo *Botrytis cinerea* em comparação ao efeito do produto sintético (Rovral®) a base de Iprodiona, indicado para o tratamento dessa patologia em morango (VISMARA, 2017). Desta forma, no presente trabalho buscou-se verificar os efeitos dos OEs de citronela e guaçatonga, nas CIMs para o *Botrytis cinerea* encontradas por Vismara (2017), sobre o desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus domesticus*, em comparação aos efeitos do fungicida sintético (Rovral®) a base de Iprodiona. Tal fungicida é classificado como perigoso ao Meio Ambiente, sendo de classe III: produto medianamente tóxico (ROVRAL – SC; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992).

Diante disso, cabe ressaltar a importância dos testes realizados com tais óleos essenciais e PFS em embrião de galinha, buscando identificar se os mesmos possuem potenciais teratogênicos sobre os organismos não alvo, já que o PFS é muito utilizado para o controle de várias doenças em plantas.

3.0 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO PARA ESTUDOS DE EMBRIOTOXICOLOGIA E TERATOLOGIA

O desenvolvimento inicial dos embriões de ave é muito semelhante ao de mamíferos e outros vertebrados (BORGES, 2017), sendo um meio vantajoso de pesquisa dos efeitos de substâncias sobre o desenvolvimento embrionário. Ele é considerado o modelo experimental mais versátil para o estudo da embriotoxicologia, pois não possui interferências maternas e humorais, tornando possível uma melhor avaliação das alterações apresentadas no desenvolvimento sobre o contato com algum composto químico estranho.

Algumas vantagens na utilização do embrião de galinha: (1) os ovos são megálécitos, ou seja, possuem reservas nutricionais, não dependendo do organismo materno para se desenvolver; (2) apresentam membranas envoltórias resistentes; (3) tempo de desenvolvimento relativamente curto (21 dias); (4) não dependem do organismo materno para se desenvolver; (5) pode ser acompanhado facilmente em laboratório pois se desenvolvem na região superior do ovo;(SCHOENWOLF, 1999). Além de sua fácil obtenção, não é necessária a eutanásia da fêmea para obter os embriões, baixo custo financeiro, e o tempo curto de desenvolvimento, facilitando a utilização dos embriões nas análises. Após a postura dos ovos, a embriogênese irá acontecer se o ovo estiver em condições favoráveis a expressão gênica e fenotípica, do programa morfogênese e organogênese estabelecidos para a espécie (WOLPERT, 2000). A espécie mais utilizada para estudos em laboratório é a galinha (*Gallus gallus domesticus*), para que haja o desenvolvimento do embrião são necessárias condições de temperatura (38°C), umidade e oxigenação, o período de incubação para que haja eclosão é de 21 dias.

A presença de substâncias estranhas no desenvolvimento embrionário pode alterar os mecanismos da embriogênese, podendo ainda ser letal. Essas anormalidades podem ser usadas como indicador do potencial teratogênico de agentes estranhos (WALTERS et al., 1987; CHO e LEE, 1990; HEINRICH-HIRSCH et al., 1990).

Diante disso, foram realizados testes para verificar se a utilização destes óleos no controle do *B.cinerea* poderia causar alguma alteração no desenvolvimento embrionário inicial de organismos não alvo, sendo este o objetivo do presente projeto, avaliando a existência ou não dos efeitos tóxicos dos agentes de controle alternativo,

sendo eles, óleos essenciais das espécies: citronela (*Cymbopogon sp*) e guaçatonga (*C.sylvestris*) utilizados como insumos agrícolas e seus efeitos comparados ao produto fitossanitário sintético base de iprodiona, estes utilizados sobre o desenvolvimento embrionário. Além disso serão analisados alguns aspectos nos embriões: taxa de mortalidade e malformações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo biológico e desenho experimental

Foram utilizados ovos fertilizados de *G. gallus domesticus* adquiridos em um incubatório comercial da cidade de Dois Vizinhos. Em laboratório, os ovos foram higienizados com papel toalha umedecido em álcool etílico 70% e identificados de acordo com os grupos experimentais (Tabela 1). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico II da UTFPR-DV e foram submetidos à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UTFPR).

Tabela 1 - Grupos experimentais e soluções utilizadas para análise de embriotoxicologia de óleos essenciais e fungicida sintético sobre embriões de *G. g. domesticus*.

Grupos experimentais/ Tratamentos	Solução	Qtde. Ovos
(1) Grupo Controle fechado	Não injetados	40
(2) Grupo Controle veículo 1 (Tween® 80 mais água destilada)	Injetados com 100µl de solução de Tween® 80 a 0,01% em água destilada	40
(3) Grupo controle veículo 2 (Tween® 80 a 1% mais soro fisiológico)	Injetados com 100µl de solução de Tween® 80 a 1% em soro fisiológico	40
(4) Grupo OE Citronela (<i>Cymbopogon</i> sp)	Injetados com 100µl de solução de óleo essencial de citronela a 62,5 µg/ml com Tween® 80 a 0,015625% mais água destilada.	40
(5) Grupo OE Guaçatonga(<i>Casearia sylvestris</i>)	Injetados com 100µl de solução de óleo essencial de guaçatonga a 4.000 µg/ml com Tween® 80 a 1% mais água destilada.	40
(6) Grupo PFS	Injetados com 100µl de solução do produto comercial Rovral® a base de Iprodiona, 3 µl do mesmo em 2 ml de água destilada (concentração recomendada pelo	40

fabricante para controle do mofo cinzento
(*Botrytis cinerea*) do morango (*Fragaria spp*).

Total 240

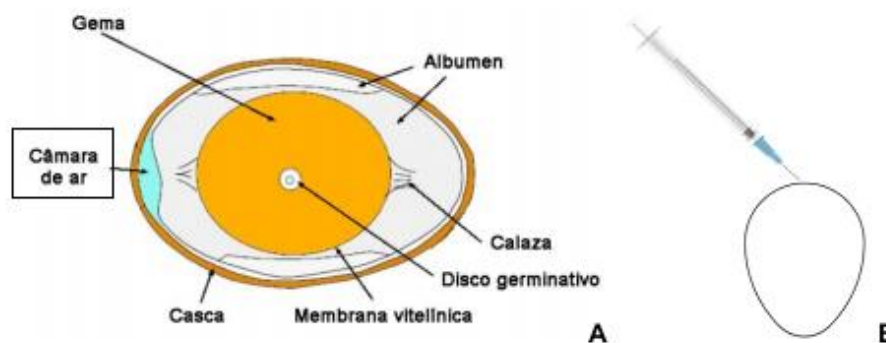
Fonte: O autor (2019)

Conforme já elucidado anteriormente, as concentrações dos OEs utilizados foram definidas de acordo com aquelas encontradas por Vismara (2017) como as CIMs para o crescimento do fungo causador do mofo cinzento (*B. cinerea*) em morango (*Fragaria spp*).

4.2 Método de exposição

Os embriões foram expostos às diferentes soluções no tempo E0 (para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente natural), através da injeção nas concentrações descritas na Tabela 1, diretamente na câmara de ar (Figura 1), local que permite melhor dispersão dos agentes no embrião (YAMAMOTO et al., 2012). A nomenclatura utilizada, usual em estudos do desenvolvimento embrionário, considera como E0 o ovo que acabou de ser colocado, E1 o primeiro dia embrionário, E2 o segundo dia embrionário e assim sucessivamente, até E21, correspondente ao dia normal de eclosão (HOUENOU e OPPENHEIM, 1994; YAGINUMA et al., 2001).

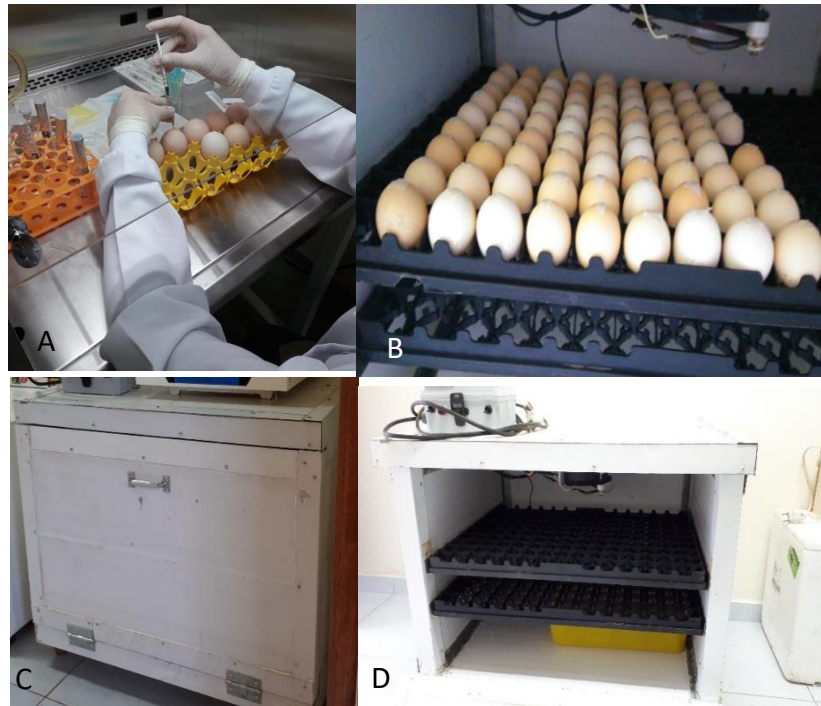
Figura 1 - Desenho esquemático do ovo de *Gallus gallus domesticus*. A: Indicação de suas partes. B: Esquema da injeção do contaminante na câmara de ar.



Fonte: Expedição Vida.

Após as injeções, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima (Figura 2) e incubados por 3 dias, em incubadora construída sob encomenda por profissional técnico capacitado, sob temperatura controlada a 38°C com umidade e ventilação constantes.

FIGURA 2 – Fotografia do momento das injeções dos contaminantes e incubação dos ovos de *G. gallusdomesticus* em incubadora, sob umidade, ventilação e temperatura constantes.

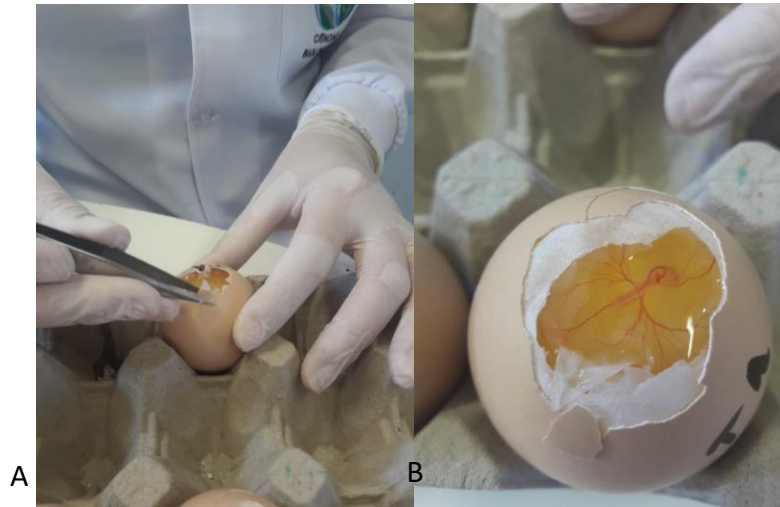


A: Registro do momento das injeções do contaminante nos ovos. **B:** Ovos já vacinados sendo encaminhados para incubação. **C:** Incubadora utilizada dos experimentos. **D:** Estrutura interna da incubadora. Fonte: Autor, (2019).

4.3 Análise morfológica

Após transcorrido o tempo de incubação (três dias), os embriões foram coletados para análise morfológica através da técnica de montagem total (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Inicialmente foi realizado uma abertura na câmara de ar dos ovos para visualização do embrião (Figura 3).

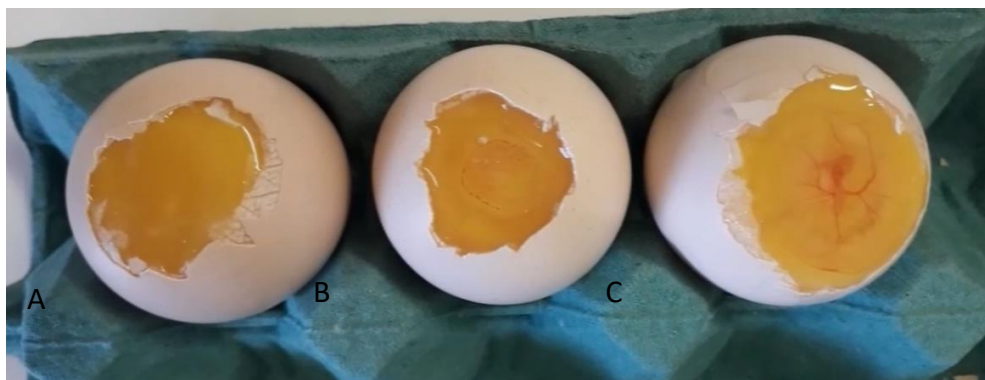
FIGURA 3 – Procedimento de abertura dos ovos.



A: Momento da abertura dos ovos. **B:** Visualização do embrião. Fonte: Autor, (2019).

Tanto os embriões considerados vivos, aqueles que apresentaram batimentos cardíacos, quanto os mortos, sem batimentos cardíacos, foram contabilizados para a análise de mortalidade. Os mortos foram descartados em seguida. Os batimentos cardíacos foram contabilizados por 15 segundos e multiplicados por quatro para obter os números de batimentos por minuto. Na Figura 4 é possível observar a diferença entre os ovos com embriões vivos, mortos e inviáveis.

FIGURA 4 – Fotografia para demonstração: ovo considerado inviável, embrião morto e embrião vivo.

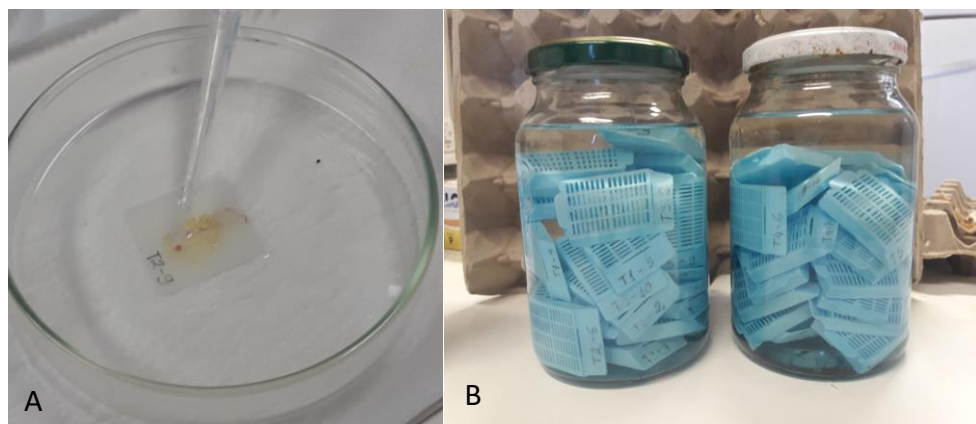


A: Ovo inviável. **B:** Ovo com embrião morto. **C:** Ovo com embrião vivo. Fonte: Autor (2019).

Na sequência os embriões foram submetidos a eutanásia através de congelamento, seguindo as normas do CONCEA (2013). Após a eutanásia, com o

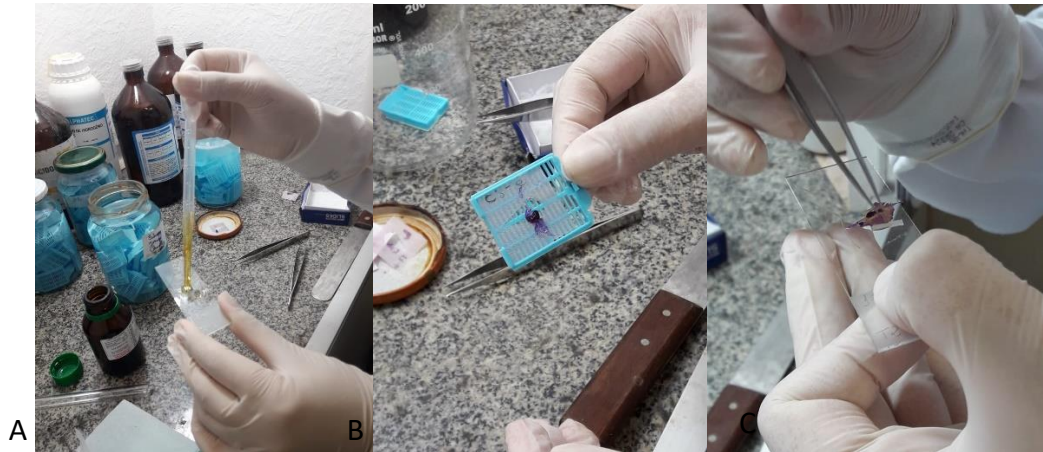
auxílio de pinça e tesoura os embriões foram retirados dos ovos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina, para remover o excesso de vitelo. Em um papel filtro retangular com um recorte em losango na região central, os embriões foram encaixados para mantê-los distendidos. Na sequência, os embriões foram colocados em cassetes e inseridos em solução fixadora Carnoy por no mínimo 2h e no máximo 48hs, e após foram colocados em álcool etílico por, no mínimo, 8hs, (Figura 5).

FIGURA 5 – Fotografia: procedimentos pós coleta dos embriões, com preparação em placa de Petry e colocados nos cassetes em fixador Carnoy.



A: Preparação dos embriões na placa de Petry. **B:** Cassetes com embriões em solução fixadora Carnoy. Fonte: Autor, (2019).

Então, os embriões foram corados com solução corante Carma Lúmen de Mayer, por até 48 horas. Após a coloração, estes foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70%, 90% e 95% por 10 minutos 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 foi utilizado o bálsamo do Canadá sintético e lamínula (Figura 6).

FIGURA 6 – Montagem das lâminas.

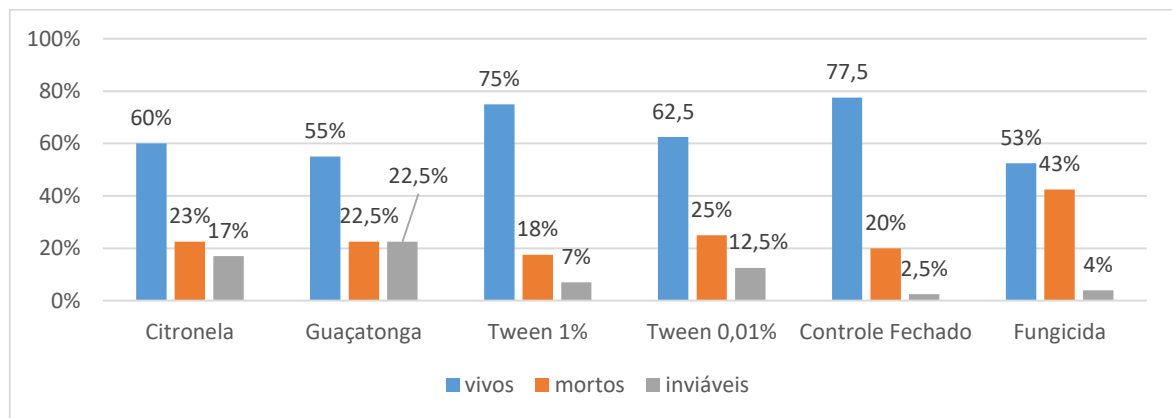
A: Adicionando Bálsamo do Canadá na lâmina. **B:** Abrindo cassete para retirada do embrião. **C:** Montando a lâmina com o embrião. Fonte: Autor, (2019).

Com as lâminas permanentes prontas, a morfologia dos embriões foi analisada em microscópio estereoscópico (Zeiss, Stemi – 305) com câmera Axiocam ERc 5s, através do Software ZEN 2.3 LITE. Os mesmos foram estagiados de acordo com a descrição de Hamburger e Hamilton (1951).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a taxa de embriões vivos, mortos e inviáveis, observa-se no gráfico 1 que o número de embriões vivos se destaca em cinco tratamentos, sendo eles a citronela, guaçatonga, Tween® 80 a 1%, Tween® 80 a 0,01% e controle fechado, já o tratamento com fungicida a base de Iprodiona obteve a maior taxa de mortalidade. O controle fechado e o Tween® 80a 1%, demonstraram uma menor taxa de mortalidade em relação aos demais tratamentos. O tratamento com Tween® 80a 0,01% apresentou um resultado não esperado, pois a taxa de mortalidade foi mais alta que o Tween® 80a 1%.

Gráfico 1 – Taxa de embriões vivos, mortos e inviáveis encontrados todos os tratamentos.



Fonte: O autor (2019).

A qualidade dos ovos depende de diversos fatores, sendo estes relacionados a idade das matrizes, que influenciam na qualidade e eclodibilidade dos ovos, também as condições de incubação interferem neste processo (SILVA, 2016, p19.) Com relação a porcentagem padrão de fertilidade e eclodibilidade, Rosa (EMBRAPA, 2010) sugere percentuais entre 86 e 96%, ainda, o Guia de Manejo e Incubação COOB (2008, p. 2) informa que em matrizes de 25 a 68 semanas este percentual varia de 88,6 a 91,8%. Logo, a taxa de ovos viáveis utilizados no experimento foi de 89% para a maioria dos grupos experimentais, ou seja, dentro do esperado. Porém a inviabilidade dos grupos tratados com os OEs de citronela e guaçatonga foi maior que 11% (Gráfico 1).

Na tabela 2 estão apresentados os resultados em relação a análise morfológica dos embriões, sendo que foram submetidos a essa análise somente os embriões vivos

no momento da abertura dos ovos. O controle fechado apresentou uma taxa de 94% de embriões normais, a maior em relação aos outros tratamentos. O Tween® 80 a 1% foi o tratamento que apresentou a segunda maior taxa de embriões normais. O Tween® 80a 0,01% demonstrou um resultado inesperado em relação aos demais por apresentar uma taxa de malformados relativamente alta se comparado com o Tween® 80a 1%.

Para a análise morfológica, foram observadas as vesículas encefálicas, brotos dos membros, curvatura do corpo, tubo neural e cauda, tanto para definição dos estágios, descritos de acordo com Hamburger e Hamilton (1951), quanto para determinar a existência (ou não) de malformações.

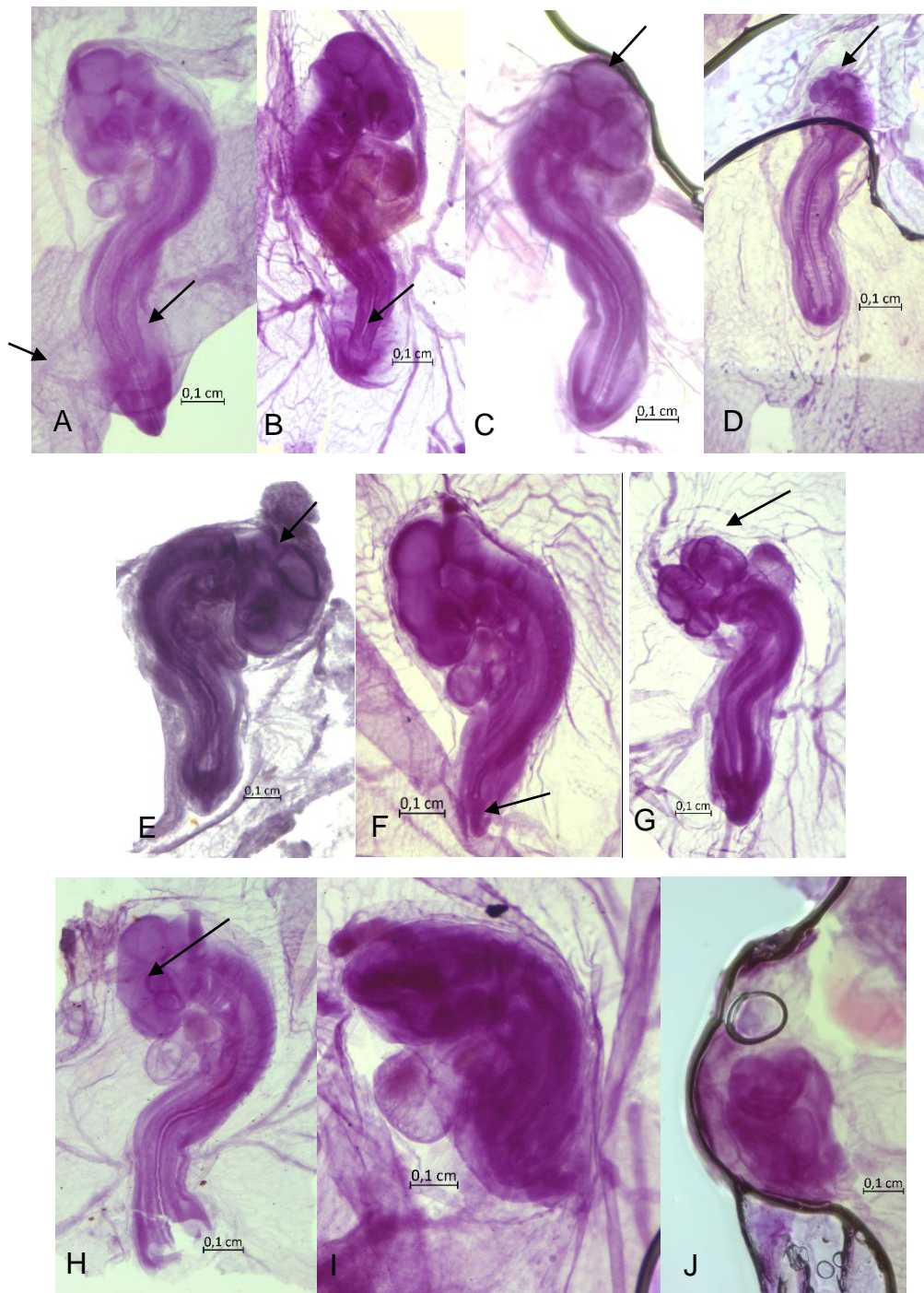
Tabela 2 – Número e porcentagem (%) de embriões normais e malformados em todos os tratamentos.

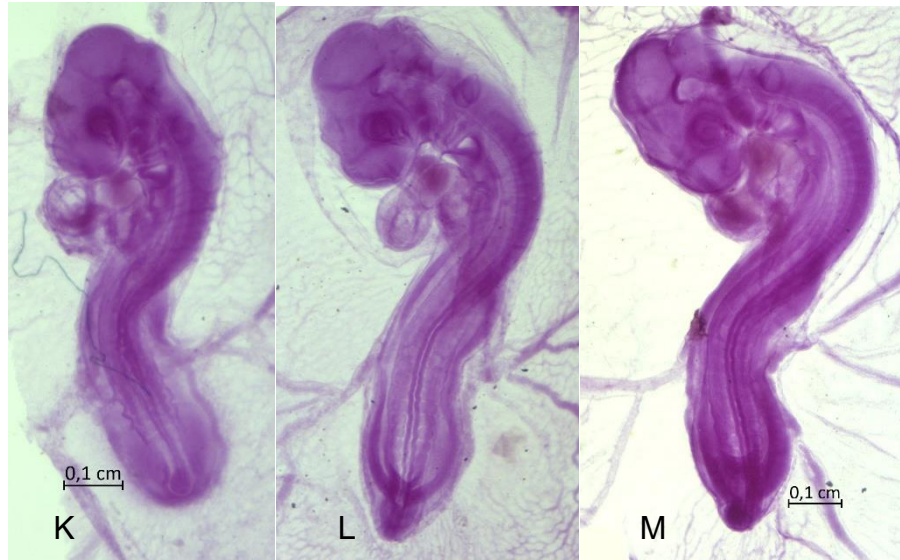
Tratamentos	Normais	Malformados	Total (100%)
(1) Controle Fechado	29 (94 %)	2 (6 %)	31
(2) Tween® 80 a 0,01%	19 (79 %)	5 (21 %)	24
(3) Tween® 80 a 1%	26 (90 %)	3 (10 %)	29
(4) <i>Cymbopogon</i> sp.	16 (72 %)	6 (28 %)	22
(5) <i>Casearia sylvestris</i> Sw	15 (68 %)	7 (32 %)	22
(6) PFS a base de iprodiona	16 (76 %)	5 (24 %)	21

Fonte: Autor (2019)

As malformações encontradas foram: Gastrosquise: malformação congênita da parede abdominal, ocasionando a saída das vísceras para fora da cavidade (KASAT, N. et al, 2016); atrofia caudal, atrofia e malformações crânio encefálica, malformação do tubo neural na região encefálica, agenesia caudal, cabeça bífida, duplicação do par de olhos, atrofia severa total e acentuadas malformações que impossibilitaram a definição do estágio de desenvolvimento de alguns embriões. Os tratamentos com os óleos essenciais e com o PFS a base de iprodiona apresentaram as maiores taxas de malformações. O Tween® 80a 0,01% apresentou uma taxa de anormalidade maior se comparado ao Tween® 80a 1%. A figura 7 apresenta imagens das anomalias encontradas e embriões normais.

FIGURA 7 – Estereofotografia (em microscópio estereoscópico (Zeiss, Stemi – 305) com câmera AxiocamERc 5s, através do Software ZEN 2.3 LITE) de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L) submetidos aos tratamentos citados na metodologia do presente trabalho.





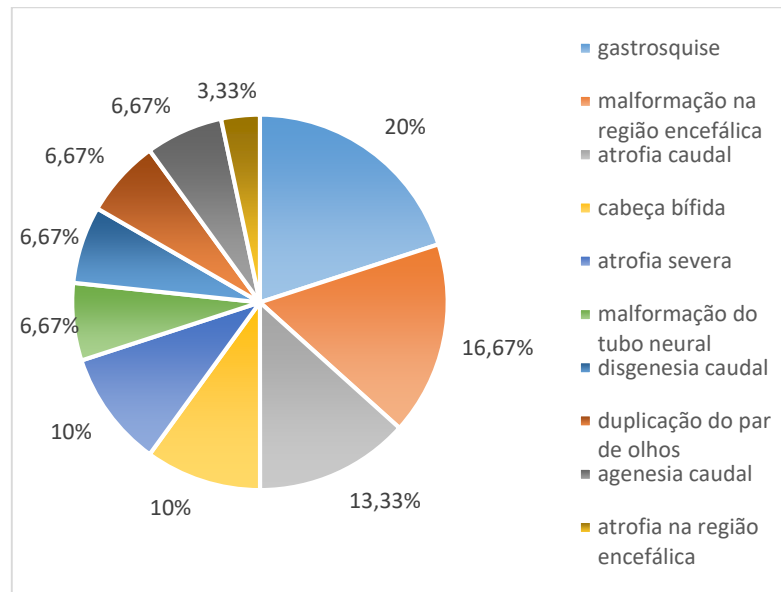
A: Gastrosquise, estágio 17 (tratado com *Cymbopogon sp.*). **B:** Atrofia caudal, estágio 17 (tratado com *C. sylvestris Sw*). **C:** Malformação encefálica, estágio 17 (tratado com PFS a base de iprodiona). **D:** Atrofia encefálica, estágio 16 (controle fechado). **E:** Malformação do tubo neural, estágio 18 (tratado com *Cymbopogon sp.*). **F:** Agenesia caudal, estágio 17 (tratado com Tween[®]80 a 0,01%). **G:** Cabeça bífida, estágio 18 (tratado com *Cymbopogon sp.*). **H:** Duplicação do par de olhos, estágio 17 (controle fechado). **I:** Acentuadas malformações, estágio indefinido (tratado com Tween[®]80 a 0,01%). **J:** Atrofia severa, estágio indefinido (tratado com *Cymbopogon sp.*). **K:** Embrião normal, estágio 16 (controle fechado). **L:** Embrião normal, estágio 17 (controle fechado). **M:** Embrião normal, estágio 18 (controle fechado). Fonte: Autor, (2019).

Embora tenham sido observadas taxa de mortalidade e anormalidade no controle fechado, é necessário ressaltar que as mesmas, em pequenas proporções, são inerentes ao desenvolvimento embrionário, em qualquer espécie, sendo que erros podem acontecer durante o desenvolvimento (CARLSON, 1996). Neste caso, o número de malformações presentes no controle fechado é aceitável.

Sobre as anormalidades que mais predominaram, no gráfico 2 é possível observá-las, sendo elas a gastrosquise, malformação da região encefálica, atrofia caudal e cabeça bífida. As demais malformações ocorreram em menor proporção.

Apesar de uma porcentagem de indivíduos não apresentar anormalidades no desenvolvimento inicial, poderia apresentar alterações no decorrer do desenvolvimento ou até mesmo após o nascimento, afetando crescimento, locomoção, comportamento, etc. (RIVERO, 2005). É importante destacar que os dados apresentados no presente trabalho se referem ao desenvolvimento embrionário inicial de três dias ou 72h, o desenvolvimento posterior não foi testado neste trabalho.

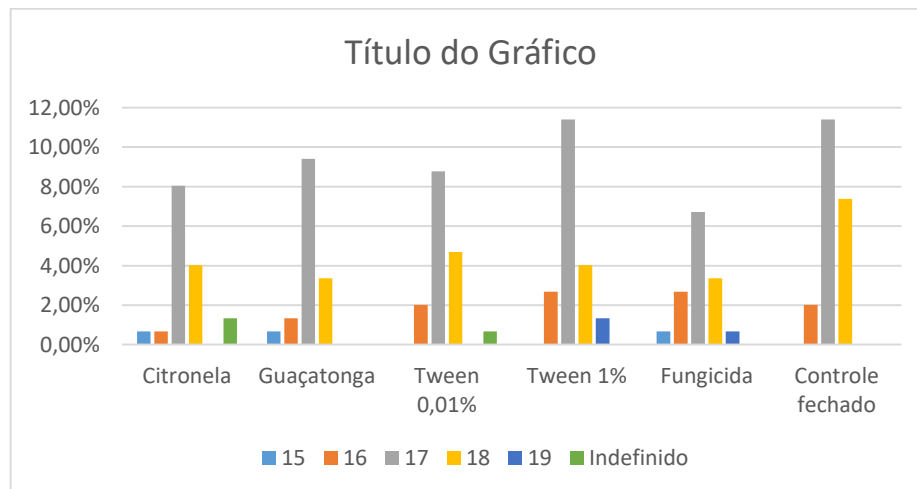
Gráfico 2 –Malformações encontradas nos embriões de *G. gallus domesticus* submetidos aos tratamentos.



Fonte: Autor (2019).

A definição dos estágios em que os embriões se encontravam foram determinados principalmente através da contagem de somitos, tamanho dos brotos das asas e pernas, vesículas encefálicas, tamanho da cauda e curvatura, de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Os estágios encontrados em cada tratamento estão representados no gráfico 3.

GRÁFICO 3 – Representação dos estágios embrionários encontrados em todos os tratamentos.



Fonte: Autor (2019)

Segundo Hamburger e Hamilton (1951), o estágio 15 ocorre entre 50 e 55 hrs, estágio 16 ocorre entre 51 e 56 hrs, estágio 17 entre 52 a 64 hrs, estágio 18 entre 65 e 69 hrs, estágio 19 entre 68 e 72 hrs. Os estágios encontrados foram: 15, 16, 17, 18 e 19. O estágio 17 foi o estágio predominante em todos os tratamentos, seguido do estágio 18. O tratamento do PFS a base de iprodiona apresentou a maior diversidade de estágios (do 15 ao 19), o tratamento à base de *Cymbopogon* sp. e Tween® 80a 0,01%, diferentemente dos demais grupos, apresentaram embriões com estágio indefinido (devido as malformações não foi possível definir o estágio). O estágio 19 foi constatado apenas no tratamento com Tween® 80a 1% e no PFS a base de iprodiona. Não foi possível determinar diferenças entre os tratamentos com os óleos essenciais e o grupo controle Tween®80 a 0,01%, visto que os dois apresentaram resultados semelhantes.

Os indivíduos expostos a menor concentração de Tween® 80 (a 0,01%) foram mais afetados, em relação ao grupo exposto a uma maior concentração (a 1%), indo de encontro com os resultados obtidos por Rivero (2005), onde houve a exposição de embriões de *G. gallus domesticus* ao acetato de chumbo, sendo observado que, os grupos expostos a uma menor concentração mostraram-se mais comprometidos em relação aos expostos a uma maior dose.

Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos que cite testes com Tween® 80 em embriões de ave (*G. gallus*), sendo assim, existem testes com o surfactante realizados em outras espécies, como em estudos feitos por Nascimento et al (2008) com Tween® 80, demonstram que o mesmo influenciou na atividade fungitóxica de concentrações do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). Ainda, segundo Lima e Villela (2017) em estudos sobre os efeitos dos óleos essenciais de alho, laranja e do surfactante Tween® 80 sobre a germinação de sementes de manjericão, verificaram que o surfactante não interferiu sobre a germinação das sementes, os resultados não se diferenciaram da testemunha. Já Santos et al (2003), em seus testes com os efeitos dos extratos orgânicos associados ao Tween® 80 na germinação e crescimento de plântulas de alface, verificou que o surfactante em questão inibiu em 76,3% o crescimento do hipocótilo, também, o mesmo inibiu em 63,8% o comprimento da radícula em relação a testemunha com água destilada. Desse modo, os trabalhos citados neste parágrafo relacionados a testes com Tween® 80, demonstram a ação do surfactante sobre diferentes organismos.

O óleo essencial de *Cymbopogon* sp é caracterizado por possuir propriedades repelentes, e pode ser utilizado contra insetos (COSTA et al., 2008). No presente trabalho, tal óleo essencial apresentou taxa de mortalidade sobre os embriões de *G. gallus domesticus* aproximada ao controle fechado, porém, a taxa de anormalidades foi mais alta. Desse modo, existem testes utilizando o óleo essencial para verificar se o mesmo possui propriedades nocivas ao desenvolvimento de outros indivíduos, como, Xavier et al (2012) que realizou testes com óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* verificando a viabilidade de sementes de feijão após o tratamento com o referido óleo, e verificou que sementes tratadas apresentaram uma menor taxa de germinação, em relação a testemunha, constatando que tal óleo influenciou na retomada do desenvolvimento da semente e o início da formação de uma nova planta.

Em testes realizados por Seixas et al (2011) com *Cymbopogon* sp. no controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans*, observou redução do crescimento micelial *in vitro* do referido fungo, ainda, em 2 a 4 dias após a repicagem observou redução em até 100% do crescimento micelial, demonstrando toxicidade sobre o fitopatógeno tratado. Ainda em estudos com extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus*, Bueno et al (2017) realizaram testes com o referido óleo sobre o desenvolvimento embrionário inicial de *G. gallus* em três concentrações (2,5%, 5% e 10%), onde os dados obtidos até o momento demonstraram efeitos teratogênicos para embriões ave (*G. gallus*).

Em estudos realizados por Debiasi (2011) com cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de *G. gallus* no grupo controle fechado 73,52% dos ovos incubados continham embriões vivos, no controle veículo do contaminante 60,97% dos embriões vivos, ainda, nos embriões expostos ao cloreto de manganês as taxas de embriões vivos foram entre 69,2% e 54%, demonstrando semelhança com os resultados obtidos no presente trabalho, sendo que a taxa de embriões vivos no controle fechado foram de 78%, nos embriões expostos a OE de citronela foram 60% e guaçatonga apresentou 55% de embriões vivos.

Casearia sylvestris é uma espécie de uso medicinal (PEZZI, 2014), a sua utilização em testes toxicológicos é indispensável para verificar a existência ou não de potenciais nocivos para os seres vivos. Em estudos realizados por Silva et al (2008) com óleo essencial de *C.sylvestris* demonstraram que os usos da planta contra diferentes tipos de câncer podem apresentar resultados positivos, uma vez que testes realizados usando dois sesquiterpenos encontrados na *C.sylvestris* apresentaram

resultados semelhantes aos verificados para o óleo essencial da planta, indicando que eles podem ser responsáveis pela ação citotóxica.

Nos resultados obtidos com o produto comercial a base de Iprodiona (Rovral®), foi observado que a taxa de mortalidade foi de 43%, relativamente alta, em relação aos demais tratamentos. Na morfologia dos embriões, 24% apresentaram anormalidades, valor este, mais baixo se comparado ao OE de *C.sylvestris*. Freitas et al. (2013) em experimentos com produtos fitossanitários pulverizados diretamente sobre *Neoseiulus californicus* (ácaro predador), o iprodiona mostrou-se levemente nocivo. Deste modo, Arcain (2017) realizou estudos com o Iprodiona sobre o desenvolvimento de *G. gallus*, onde constatou que a dose letal (L_{50}) para tais embriões foi de aproximadamente 100µl/ml, correspondendo a 67 vezes a dose recomendada para uso, ainda, os embriões que sobreviveram ao tratamento, até o dia sete de desenvolvimento não apresentaram alterações no peso total e nem no estadiamento. Além disso, o (a) autor (a) informa que o tratamento com Iprodiona levou a 13% dos embriões com alterações morfológicas, sendo elas em sua maioria hemorragias, e diferenças oculares do lado esquerdo, em menor proporção, ocasionou membros não desenvolvidos, ausência de bico, encéfalo visivelmente diminuído, etc. Comparando o artigo citado anteriormente com os dados do presente trabalho, é possível verificar que a dose recomendada para uso, apesar de ser 67 vezes menor que a L_{50} , apresenta toxicidade no desenvolvimento embrionário inicial de *G. gallus*, demonstrando taxa de mortalidade de 43%, ainda, daqueles embriões que sobreviveram, 24% possuíam anormalidades.

6 CONCLUSÕES

- Tanto os OEs quanto o produto fitossanitário sintético a base de iprodiona (Rovral®) apresentam toxicidade ao desenvolvimento de *G.gallus* levando a malformações e até mesmo a morte, porém o produto fitossanitário provocou maiores danos aos embriões. Dentre as malformações observadas, a gastrosquise e as anormalidades da região encefálica foram mais numerosas.
- O controle veículo utilizado (Tween®80) também provocou efeitos deletérios ao desenvolvimento embrionário de ave, o que dificultou mensurar o quão prejudicial foram os OEs. Interessantemente, o Tween®80 em menor concentração provocou efeitos mais nocivos em relação a maior concentração, talvez, devido a maior resiliência do organismo do embrião quando submetido a concentrações mais elevadas.
- Estudos com outras concentrações de Tween®80 são necessários para melhor esclarecer sobre os efeitos que esse produto pode causar.
- Tais resultados nos alertam sobre os efeitos que os OEs podem provocar, bem como o produto fitossanitário e o Tween®80. As malformações encontradas nos embriões indicam potenciais riscos à saúde humana, visto que as fases iniciais do desenvolvimento dos embriões de ave são muito semelhantes às dos mamíferos. Dados como estes, contribuem com os sistemas alternativos de produção, levando em consideração o aumento da utilização de produtos naturais e inofensivos ao meio ambiente e saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC. **Agência Embrapa de informação tecnológica**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fy1j9mkr02wx5ok0pvo4k3kktngb1.html> Acesso em: 17 de maio 2019.
- ALBUQUERQUE; A. C. S.; SILVA, A.G. **Agricultura Tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Produção e produtividade agrícola**, Brasília, v 1. Brasília: Embrapa, 2008.
- ARCAIN, B. M. S. **Efeito do Iprodiona (Rovral®) em *Gallus gallus***. 2017. 87 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas –Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz dolguaçu, 2017.
- 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, p. 322–327, 2013.
- BERTI, F. V. Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na **viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- BORGES, M.E.; **Uso do Embrião de Ave (*Gallus gallus*) Como Organismo Modelo para Embriotoxicidade do chumbo e arsênio**. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - **Departamento de Biologia Celular** - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. UFPR, Curitiba.
- BRUM, R.B.C.S. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal na Universidade Federal do Tocantins). Gurupi – Tocantins. Jan. 2012.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Jaguariúna, São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- CARLSON, B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996.
- CCM Saúde. **Atrofia: definição**. Disponível em: <<https://saude.ccm.net/faq/2059-atrofia-definicao>> Acesso em: 18 de maio 2019.
- CHO, J.-H.; LEE, C.-E. **Effects of diazinon on the anatomical and embryological changes in the developing chick embryo**. RDA Journal of Agricultural Science 32 (3):35-47, 1990.
- COSTA, C. M. G. R., SANTOS, M. S., BARROS, H. M. M., AGRA, P. F. M., FARIAS, M. A. A. **Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora***. Tecnologia & Ciências Agropecuária, João Pessoa, v. 2, p. 11-14, 2008.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; RESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. **Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos.** Scielo. Rev. bras. Plantas med. vol.13 no.2 Botucatu, 2011.

DEBIASI, M.M.; **Análise morfológica da ação do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus*.** Monografia (especialização) – Universidade Federal do Paraná, setor de Ciências Biológicas. Curitiba, 2011. 49f.

EMBRAPA. **Controle Biológico**, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/fold0608_controleBiologico.pdf/71cf43ce-0f8e-46da-ac5a-4c76688170e5> Acesso em: 22 set. 2018.

EMBRAPA. **VISÃO 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira.** Brasília, DF. 2018.

FARHAT, A. et al. **In Ovo effects of two organophosphate flame retardants - TCP 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.

FREITAS, J. A. et al. **Impacto de produtos fitossanitários utilizados na cultura do morangueiro sobre a população do predador *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae).** Revista Agrogeoambiental, Pouso Alegre, v. 5, n. 1, p. 49-60, abr. 2013.

GARCIA, E.G.; BUSSACOS, M.A.; FISCHER, F.M. **Impacto da Legislação no Registro de Agrotóxicos de maior Toxicidade no Brasil.** São Paulo, 2002.

GRIGORI, P. **Governo liberou registros de agrotóxicos altamente tóxicos.** Agência Pública / Repórter Brasil | 18/01/19. Disponível em: <<https://reporterbrasil.org.br/2019/01/governo-liberou-registros-de-agrotoxicos-altamente-toxicos/>> Acesso em: 21 de Março de 2019.

COOB. **Guia de Manejo de Incubação COB.** 2008. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Guia_incuba%C3%A7%C3%A3o_Cobb.pdf> Acesso em: 16 de maio 2019.

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.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88: 49-92, 1951.

HEINRICH-HIRSCH, B.; HOFFMAN, D.; WEBB, J.; NEUBERT, D. **Activity of aldrinepoxidase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase during the development of chick embryos *in ovo*.** *Archives of Toxicology* 64 128-134, 1990.

HOUENOU, L. J.; OPPENHEIM, R. W. **Motoneuron death during developmental, following injury and in neurological disease.** *The Neuroscience*, 6: 283-289, 1994.

IBEROQUÍMICA. Magistral. **Óleo de Citronela**. Disponível em:
<<https://www.iberquimica.com.br/Arquivos/Insumo/arquivo-113536.pdf>> Acesso em:
28 de março de 2019.

KASAT, N.; DAVE, N.; SHAH, H. MAHAJAN, S. **Correcção de gastrosquise sob anestesia caudal: uma série de três casos**. Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. 2016.

KUGLER, H. **Paraíso dos Agrotóxicos**: Substâncias já proibidas em vários países encontram mercado fértil em terras brasileiras. Rio de Janeiro: Ciência hoje, 2012.

LIMA, C.B.; VILLELA, T.T.; **Efeito dos óleos essenciais de alho e laranja e do surfactante Tween®80 sobre a germinação de sementes de manjerição**. Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, PR, Brasil. Rev. Ciênc. Agroamb. v.15, n.2, 2017.

LUPE, F.A.; **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da amazônia**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. **Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos**. Revista de Ciências Ambientais, Canoas, v.6, n.2, p. 95 a 112, 2012 / ISSN 1981-8858.

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.

MARTINS, E.S.C.S.; et al. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle in vitro da bactéria *Ralstoniasolanacearum* em tomateiro**. 1Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. Tecnol. &Ciên. Agropec., João Pessoa, v.3, n.3, p.29-34, set. 2009.

MATSUSHITA, M.S. **Espécies da Sociobiodiversidade vegetal de um fragmento do Bioma Floresta Ombrófila Mista e ajuste do modelo matemático para estimativa de fitomassa foliar de guaçatonga (*Casearia decandra* Jacq.)** 2010. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba.

MAZARO, S. M. et al. **Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea* in vitro**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15. 208–216, 2013. ISSN 1516-0572.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do **CONCEA**, 2013 (Resolução Normativa CONCEA no 13, de 20 de setembro de 2013).

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html>
Acesso em: 21 de maio de 2019.

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

NASCIMENTO, F.R. et al. **Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes)**. ACTA AMAZONICA. vol. 38(3) 2008: 503 – 508.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

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

PEZZI, A. *Casearia sylvestris*: **Análise Quali-quantitativa do óleo essencial, sua ação fungicida *in vitro* sobre fitopatógenos e estudo sobre rizogênese**. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104 p.) Março, 2014.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, CASA CIVIL. **Lei nº 7.802**, de 11 de julho de 1989.

RIVERO, L. B. D. **Exposição de embriões de *Gallus gallus domesticus* ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal**. Dissertação programa de pós-graduação Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis- SC, 2005.

ROVRAL – SC. FMC. **Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** - MAPA sob nº 02208591. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/rovralsc250418.pdf>> Acesso em: 21 de maio de 2019.

SAMINÉZ, T.C.O.; DIAS, R.P.; NOBRE, F.G.A.; MATTAR, R.G.H.; GONÇALVES, J.R.A. **Princípios norteadores da produção orgânica de hortaliças**. Circular Técnica 67 EMBRAPA HORTALIÇAS/MAPA. Brasília, DF, 2008.

SANTOS, C. C. et al. **Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante tween 80, na germinação e crescimento de plântulas de alface**. Ciência e Agrotecnologia, v. 28, n. 2, p. 296-299, 2003.

SEIXAS, P.T.L.; et al. **Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto Citronelal**. Scielo. Rev. bras. Plantasmed. Vol. 13 no.spe Botucatu, 2011.

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.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos**. Floresta, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

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.

SHIMABUKURO, K.; MARTINEZ, K. **Agricultura Tóxica: um olhar sobre o modelo Agrícola brasileiro**. Greenpeace, 2017.

SMIDT, D.O. **Os agrotóxicos e seus efeitos no meio ambiente**. Centro Universitário de Brasília - UniCEUB. Faculdade de Ciências da Saúde. Licenciatura em Ciências Biológicas. Brasília, 2001.

SILVA, S.L. et al. **Avaliação citotóxica do óleo essencial de *Caseariasylvestris* Sw sobre células cancerígenas humanas e eritrócitos**. Scielo. *Acta Amaz.* vol.38 no.1 Manaus, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672008000100012> Acesso em: 24 set. 2018.

SILVA, G.F. **rendimento da incubação e perda de calor dos ovos durante a transferência da incubadora para o nascedouro**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Dracena: [s.n.], 2016. 60 f.

SILVEIRA, S.M. et al. **Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda)**. *Rev. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo*, 2012; 71(3):471-80.

SOUKY, N. V. et al. **Arsenic stimulates angiogenesis and tumorigenesis in vivo**. *Toxicologicalsciences*, v. 76, n. 2, p. 271–279, 2003.

SOUSA, M.F. et al. **Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos no estado de Alagoas, Brasil**. *Rev. Bras. de Agroecologia*. 7(1): 132-138 (2012).

TERRA, F.H.B. **A Indústria de Agrotóxicos no Brasil**. 2008, 156 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2008.

VISMARA, L.S.; et al. **Antifungal activity of essential oils about *Botrytis cinerea***. Federal Technological University of Paraná, Campus Dois Vizinhos, 2017.

XAVIER, M.V.A.; OLIVEIRA, C.R.F.*; BRITO, S.S.S.; et al. **Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogonwinterianus* Jowitt)**. SCIELO. *Rev. bras. Plantas med.* Vol. 14 no.speBotucatu, 2012.

YAGINUMA H.; SHIRAIWA, N.; SHIMADA, T.; NISHIYAMA, K.; HONG, J.; WANG, S.; MOMOI, T.; UCHIYAMA, Y.; OPPENHEIM, R. W. Caspase activity is involved in, but is dispensable for early motoneuron death in chick embryo cervical spinal cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 18: 168-182, 2001.

YAMAMOTO, F. O.; NETO, F. F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick

embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

WALTERS P, KHAN S, O'BRIEN PJ, AND RAHIMTULA AD. **Effectiveness of Prudhoe Bay crude oil and its aliphatic, aromatic and heterocyclic fractions in inducing mortality and arylhydrocarbon hydroxylase in chick embryos in ovo.** *Archives of Toxicology*, 60: 454-459, 1987.

WOLPERT, L. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento.** Porto Alegre: Artmed Ed., 2000.