

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ– UTFPR  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SILVANE ZANCANARO DE OLIVEIRA

**EMBRIOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (Linnaeus, 1767) EM GALINHA (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO.

DOIS VIZINHOS  
2019

SILVANE ZANCANARO DE OLIVEIRA

**EMBRIOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (Linnaeus, 1767) EM GALINHA (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia de Freitas Franchi



## TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso

**EMBRIOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (Linnaeus, 1767) EM GALINHA (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758)**

por

**Silvane Zancanaro de Oliveira**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 16:00 horas do dia 18 de junho de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado

---

Membro 1  
Lilian de Souza Vismara  
Doutoranda

---

Patrícia Freitas Franchi  
Orientadora  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

Membro 2  
Adrieli Signorati  
Doutoranda

---

Coordenador do Curso de Ciências  
Biológicas  
UTFPR – Dois Vizinhos

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

*“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

## **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, e por ter construído a incubadora necessária para que fosse possível meu experimento.

Aos meus filhos Raissa e Eliezer por entenderem minha ausência.

Agradeço a minha orientadora Patrícia Freitas Franchi pela amizade, paciência de me ouvir e me incentivar, por ser exemplo de pessoa alegre e determinada, por ter me sugerido este trabalho tão lindo e principalmente por me indicar o caminho correto para que fosse possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a professora Lilian de Souza Vismara por acompanhar todo o experimento e dar várias sugestões por compartilhar as alegrias, fazendo com que as horas passassem tão rápido que nem percebesse e por deixar-me fazer parte de seu trabalho.

Agradeço meus pais pelo incentivo e por me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço aos meus amigos que 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.

Muito obrigada!

## RESUMO

OLIVEIRA, Silvane Zancanaro de. **EMBRIOTOXICIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* (Linnaeus, 1767) EM (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758). 33 pg.** 2019 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

Com o aumento populacional e, conseqüentemente o aumento da demanda por alimento, houve a intensificação do uso de produto(s) fitossanitário(s) sintético(s) (PFS) na produção agrícola. Devido aos desequilíbrios ambientais causados pelo uso excessivo dos PFS, surgiu a necessidade de se estudar e utilizar sistemas alternativos de produção. Destes, uma das formas constitui-se da utilização de produtos naturais que não interfiram no desenvolvimento da planta, para que ela adquira naturalmente resistência, e que causem o mínimo possível de impacto ambiental e não prejudiquem a saúde humana e dos demais animais que habitam o ambiente. Devido aos problemas apresentados propôs-se estudar os efeitos que um desses agentes de controle alternativo pode apresentar sobre o desenvolvimento embrionário de galinha (*Gallus gallus domesticus*). No presente trabalho investigamos os efeitos do óleo essencial (OE) de árvore-do-chá (*Melaleuca alternifolia*), em comparação com produto fungicida sintético (a base de Iprodiona) e duas concentrações de Tween 80<sup>®</sup>, sobre o desenvolvimento embrionário de galinha. Essas concentrações foram aplicadas diretamente na câmara de ar, previamente à incubação dos ovos. Após incubação dos ovos por três dias, os embriões foram analisados quanto à taxa de mortalidade e morfologia externa. Nos resultados obtidos a maior taxa de mortalidade e malformações foi no tratamento com o produto sintético a base de Iprodiona. Pode ser que o Tween 80<sup>®</sup> tenha influenciado nos resultados do tratamento do óleo essencial *Melaleuca alternifolia*. Contudo foi concluído que todos os tratamentos perturbaram o desenvolvimento normal do embrião. Qualitativamente, conclui-se que o OE *Melaleuca alternifolia* não ocasionou aumento nas malformações nem de mortalidade.

**Palavras-chave:** Organismos não-alvo. Controle alternativo. Saúde humana. Produto(s) fitossanitário(s) sintético(s).

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Silvane Zancanaro de. **EMBRYOTOXICITY OF *Melaleuca alternifolia* (Linnaeus, 1767) ESSENTIAL OIL IN CHICKEN (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758)**. 33 pg. 2019. Course Conclusion Work (Undergraduate Degree in Biological Sciences - Licenciatura), Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

With the increase in population and, consequently, the increase in demand for food, there was an intensification of the use of synthetic phytosanitary products (PFS) in agricultural production. Due to the environmental imbalances caused by the excessive use of PFS, the need arose to study and use alternative systems of production. Of these, one of the forms is the use of natural products that do not interfere with the development of the plant, so that it naturally acquires resistance, and which causes the least possible environmental impact and does not harm human health and other animals that inhabit the environment. Due to the problems presented it was proposed to study the effects that one of these alternative control agents may present on the embryonic development of chicken (*Gallus gallus domesticus*). In the present work we investigated the effects of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, in comparison with synthetic fungicide product (the base of), on the embryonic development of chicken. A concentration of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*), fungicidal product at the concentration recommended by the manufacturer and two concentrations of Tween 80® were applied directly to the air chamber prior to incubation of the eggs. After incubation of the eggs for three days, the embryos were analyzed for mortality rate and external morphology. In the results obtained the highest mortality rate and malformations was in the treatment of the synthetic product based on Iprodione. It maybe that Tween 80® has changed in the results of *Melaleuca alternifolia* essential oil treatment. However, it was concluded that all treatments disrupted the normal development of the embryo. Apparently the essential oil *Melaleuca alternifolia* did not cause malformations nor mortality.

**Keywords:** Non-target organisms. Alternative control. Human health. Synthetic phytosanitary products.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÕES BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>10</b>
2.1	AGRICULTURA	10
2.2	CONTROLES DE FITOPATÓGENOS NA AGRICULTURA	11
2.2.1	Controles alternativos	12
2.3	<i>Melaleuca alternifolia</i>	13
2.4	EMBRIOTOXICOLOGIA	14
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	16
3.2	MÉTODO DE EXPOSIÇÃO	17
3.3	AVALIAÇÕES DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	18
3.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo na agricultura foram realizados vários trabalhos de suma importância, pois é através dela que se realiza o cultivo de vários alimentos que estão na mesa das famílias no mundo inteiro. Tratando-se em economia brasileira, esses produtos cultivados são utilizados para exportação, o qual é muito importante para o capital do país, mas para que essas exportações aconteçam é necessário que haja grande produtividade de alimentos.

Com a grande expansão agrícola, afim de suprir as necessidades, aumentam as plantações, com isso aumenta a preocupação com fitopatógenos como fungos e insetos que são atraídas por essas plantações, aumentando a quantidade de agrotóxicos utilizados para o controle dessas pragas, fazendo com que o uso de produto(s) fitossanitário(s) sintético(s) (PFS ) aumente (MARTINEZ, 2017).

Pensando em controlar fitopatógenos procura-se estudar sistemas alternativos de produção. Dentre esses, uma das formas constitui-se da utilização de produtos naturais, que não interfiram no desenvolvimento da planta, e permita que a planta adquira naturalmente resistência, e conseqüentemente, causando o mínimo possível de impacto ambiental e de danos à saúde humana e dos demais animais que habitam o ambiente.

Procura-se aplicar meios alternativos de controle de fitopatógenos afim de se ter uma colheita livre de PFS. Com o aumento das plantações aumenta-se também a procura por métodos de controle alternativo. Esses métodos causam menor impacto a biodiversidade, à saúde humana e aos animais, causando menor desequilíbrio por não interferir nos organismos não alvos (BETTIOL, 2007).

O uso do embrião de ave é considerado uma ferramenta valiosa para estudar o efeito de substâncias químicas ou de agentes de controle alternativo sobre o desenvolvimento embrionário (SCHOENWOLF, 1999). Os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e humanos se assemelham (MOORE & PERSAUD, 2008), permitindo que possamos extrapolar os resultados quanto aos riscos da exposição humana a agentes contaminantes (BASU et al., 2013; FARHAT et al., 2013; HEID et al., 2001; SHARP; FEDOROVICH, 2015; SOUCY et al., 2003)

O desenvolvimento desta nova abordagem no estudo do potencial tóxico de agentes de controle alternativo (óleo essencial) foi baseado na falta de informações

acerca do assunto. Para que um agente de controle alternativo tenha potencial como insumo agrícola, é necessário que o mesmo seja seguro tanto aos organismos não alvo de um determinado ecossistema exposto a esse agente, como a própria população humana. As frequentes questões envolvendo este tema têm crescido muito nas últimas décadas e as condições de estudos do problema não aumentou na mesma proporção, ou seja, a emissão de um diagnóstico preciso onde fosse possível avaliar de fato os efeitos realísticos dos agentes de controle alternativo a que estamos expostos sempre foram muito aquém das expectativas.

Pensando em PFS, onde se utiliza produto sintético a base de Iprodiona com intuito de inibir o crescimento do fungo *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) agente causador de doença que ataca as plantas desde flores, frutos, folhas, caule e raiz, diminuindo a viabilidade dos frutos e interferindo até mesmo no desenvolvimento da planta. Afim de utilizar meio alternativo com a mínima concentração inibitória do crescimento desse fungo.

O óleo essencial (OE) da árvore-do-chá (*Melaleuca alternifolia*), pertencente à família Myrtaceae, é originária da Austrália, no Brasil essa planta é utilizada como planta ornamental, apresenta poder antifúngico e antibacteriano, o óleo essencial é encontrado principalmente nas folhas onde os métodos mais utilizados para a extração desse óleo é através de destilação ou hidrodestilação, sendo um dos métodos mais eficaz e barato.

No presente trabalho objetivou-se analisar seus efeitos, em comparação com produto fungicida sintético (a base de iprodiona) com concentração, sobre o desenvolvimento embrionário de galinha (*Gallus gallus domesticus*), afim de elucidar se este agente de controle alternativo pode ou não causar danos ao desenvolvimento embrionário de galinha.

## 2 REVISÕES BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AGRICULTURA

Durante muito tempo já consegue-se ter indícios de que a terra era aproveitada para retirada de produtos afim suprir as necessidades dos povos que ali habitavam. No Brasil, há dados arqueológicos que revelam as atividades agrícolas existentes em tempos remotos, isso a partir de 4 mil anos atrás. Desde a chegada dos portugueses no Brasil já haviam trabalhos pacientes de seleção de plantas, passados de geração a geração por milhares de anos. Não é de se estranhar que os índios foram os pioneiros em se tratando do cultivo de produtos retirados da terra para a sobrevivência (ALBUQUERQUE; SILVA, 2008).

Segundo Silva, 2014 há tempos atrás, já se faziam exportações de produtos agrícolas, e com o pouco lucro retirado da agricultura as pessoas passaram a migrar para as cidades abandonando o campo. O governo, observando que precisava suprir as necessidades de exportação, começou a aumentar os preços dos produtos comercializados nas cidades, fazendo com que as pessoas voltassem a residir no campo e trabalhar na agricultura.

Em 1950 a maioria dos produtos eram exportados, em um período posterior os produtos passam a ser industrializados, para que a agricultura passasse a ter contato direto com o comércio, implantando indústrias fornecedoras de insumos básicos para a agricultura. Contudo, os agricultores não podiam deixar a produção pelo naturalismo, pois com o tempo o solo ia secando e acabando os nutrientes contidos nele, deixando de ter a mesma produtividade. As soluções que eram buscadas para resolver o esgotamento do solo e também os ataques de pragas, obrigava o investimento em insumos químicos. Com isso, houve um grande interesse em investimentos na produção, assim desenvolveram-se mecanismos físico-químicos, mecânicos e biológicos aplicados a agricultura. Como exemplo de inovação biológica, através das forças naturais, fazer com que a terra consiga superar os limites, quanto às inovações mecânicas, foram implantadas máquinas, como tratores para aumentar a produtividade com mais eficiência e rapidez. As inovações físico-químico eram responsáveis em atender a demanda de fertilizantes e defensivos (SILVA, 2014).

## 2.2 CONTROLES DE FITOPATÓGENOS NA AGRICULTURA

Os desenvolvimentos nas inovações químicas são indispensáveis para o aumento da produtividade. Segundo Romero (2007, p. 236), as propriedades ativas dos “pesticidas perturbam enormemente a atividade biológica no interior dos solos, os quais já se encontram afetados pela redução do teor de matéria orgânica e pelo excesso de trabalho mecânico”. O autor ainda complementa com os problemas encontrados ao decorrer do “excesso de nitrogênio adicionado aos solos, que polui a água e causa desequilíbrios nutricionais que atingem animais e o próprio homem” (ROMERO, 2007, p. 237).

Com a grande expansão agrícola, afim de suprir as necessidades da população, se aumenta as plantações, como consequência se acresce a preocupação com fitopatógenos que são atraídos por essas plantações, aumentando a quantidade de PFS utilizados para o controle dessas pragas, fazendo com que o uso de produtos químicos aumente (MARTINEZ,2017).

Contudo no decorrer do tempo, o uso contínuo desses produtos químicos acaba causando resistência nesses fitopatógenos, fazendo com que haja maior interesse em desenvolver produtos ainda mais eficazes. Em meio a várias pesquisas, foram desenvolvidas diversas formas de controlar esses fitopatógenos, uma delas é o controle alternativo que pode ocorrer naturalmente. Este regula a quantidade de plantas e animais através dos inimigos naturais, envolve a densidade recíproca onde uma população é regulada por outra população, no qual um ser vivo ataca outro ser vivo de espécie diferente regulando seu crescimento (BUENO *et al.*, 2017).

Outra forma é o controle químico ou fitossanitário sintético, que foi descoberto pelo químico Paul Hermann Müller. O primeiro PFS moderno de grande eficácia conhecido, como DDT (dicloro difenil tricloroetano), descoberto após a Segunda Guerra Mundial, apesar de ser considerado de grande eficácia para o controle de fungos e insetos, também comprovou ser de grande risco para a saúde humana e meio ambiente. O que banuiu o seu uso. Mas essa descoberta foi a abertura para novas pesquisas, nas quais o Brasil e vários outros países passaram a investir. Assim, foram desenvolvidas várias substâncias (produtos fitossanitários sintéticos), todas de uso controlado devido ao grande risco que pode ter a saúde humana com o decorrer do tempo em que são utilizadas (PEREIRA, 2013).

Atualmente no Brasil, há poucos agricultores que produzem produtos orgânicos. Neste tipo de plantação, é estipulado ao agricultor realizar a plantação causando o mínimo de impacto ao meio ambiente, onde o foco principal é a sustentabilidade econômica e ecológica do ecossistema, sendo proibido o uso de materiais sintéticos ou organismos geneticamente modificados (DECRETO nº 6.323/BRASIL, 2007).

### 2.2.1 Controles alternativos

Torna-se difícil produzir alimentos livres de produtos agroquímicos em quantidades suficientes para suprir as demandas da população. Com isso, são procurados meios alternativos de controle de fitopatógenos afim de se ter uma colheita livre de PFS. Com o aumento das plantações aumenta-se também a procura por métodos alternativos de controle. Esses métodos causam menor impacto a biodiversidade, à saúde humana e aos animais, causando menor desequilíbrio por não interferir nos organismos não alvos (BETTIOL, 2007).

Nesse sentido, foram realizados estudos nos municípios de Arapiraca, região agreste, e Santana do Mundaú, no estado de Alagoas, aplicando questionários aos agricultores que produziam produtos orgânicos. Os extratos vegetais são os de maior utilização em se tratando de controlar insetos-pragas, os mais utilizados citados pelos agricultores são: alho (*Allium sativum*), cebola (*Allium sepa*), arruda (*Ruta graveolens*), manjerição (*Ocimum basilicum*) entre outras (SOUSA; SILVA; BRITO; FURTADO, 2012).

Muitas plantas contêm propriedades antimicrobianas para o controle de fitopatógenos e são menos prejudiciais à saúde humana. Dentro de várias propriedades temos o exemplo do capim citronela (*Cymbopogon nardus*). Na Indonésia seu uso é de grande importância devido ao poder calmante e digestivo. Seu óleo essencial é repelente, fungicida e bactericida (OOTANI *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2010 apud BRUM, 2012). Trabalhos realizados com o óleo essencial do capim citronela, afim de avaliar *in vitro* seu efeito sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, demonstraram que este teve menor crescimento micelial comparado com a

testemunha, sendo o de melhor resultado encontrado com óleo essencial puro (BRUM, 2012).

Lorenzetti *et al.* (2011), também realizaram experimentos com óleos essenciais de diversas plantas medicinais. Estes foram testados contra o fungo *Botrytis cinerea*, que causa a doença do mofo cinzento do morangueiro. Avaliaram o crescimento micelial, a germinação e a produção de esporos, e elucidaram que os óleos com a melhor eficiência na atividade fungicida foram os de palmarosa (*Cymbopogon martinii*), canela (*Cinnamomum verum*) e menta (*Mentha arvensis*).

### 2.3 *Melaleuca alternifolia*

A planta originária da Austrália também conhecida como árvore-do-chá, pertence à família Myrtaceae é distribuída em locais tropicais e subtropicais (BARBOSA; PAULA *et al.* 2004). Vários estudos farmacológicos comprovam que o OE de *Melaleuca* possui propriedades antisséptica, bactericida, cicatrizante, expectorante, fungicida, antiviral. Sendo utilizado como tratamentos em cortes, arranhões, ferimentos antibacterianas e antifúngicas, como é o caso da onicomicose. (CORAZZA, 2004)

Segundo Cavalari (2017) “Além de ser também despigmentante, conservante natural e anti-caspa. Por ser antiviral e antifúngica, ela é usada para tratar também herpes, furúnculos, pé de atleta, gengivite, aftas, psoríase, acne e impetigo. ”

Através da destilação ou hidrodestilação é obtido o OE da *Melaleuca* retirada das folhas frescas da árvore, sendo esses métodos muito eficientes e o com baixo custo para a extração dessa substância. O líquido retirado das folhas conte concentração de óleos essenciais testados em laboratórios, que comprovam a importante ação germicida, antibacteriana e anti-inflamatória, que inibe o crescimento de diversos microrganismos (SIMÕES *et al.*, 2002).

Por isso havia o interesse de se testar o OE *Melaleuca* em *Botrytis cinerea* (mofo cinzento). VISMARA (2019, tese não publicada).

O *Botrytis cinerea* em se tratar de uma doença fúngica é um dos maiores problemas que causa a diminuição de produção de morango, este fungo interfere desde a planta no campo até o seu desenvolvimento após colheita, por se tratar de um fruto muito perecível (LORENZETTI, *et al.* 2011). *Botrytis* apresenta micélio com

hifas ramificadas, septadas com coloração marrom acinzentado (SANTOS, *et al.*2008).

## 2.4 EMBRIOTOXICOLOGIA

O uso do embrião de ave é considerado uma ferramenta valiosa para estudar o efeito de substâncias químicas ou outros agentes estranhos sobre o desenvolvimento embrionário. Alguns trabalhos mostram que para reproduzir uma situação mais realística, deve-se injetar o composto na gema do ovo antes do início da incubação (POWELL *et al.*, 1996; HENSHEL *et al.*, 1997) o que, no entanto, ainda é discutido.

Na embriotoxicologia, a utilização do embrião de ave tem sido fortemente ampliada, pois seu desenvolvimento externo evita que determinadas análises, como a exposição a contaminantes, possam sofrer alterações devido a interação embrião/progenitor (MATTSON *et al.*, 2015). Além disso, os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e humanos se assemelham (MOORE; PERSAUD, 2008), permitindo que possamos extrapolar os resultados quanto aos riscos da exposição humana a agentes contaminantes (BASU *et al.*, 2013; FARHAT *et al.*, 2013; HEID *et al.*, 2001; SHARP & FEDOROVICH, 2015; SOUCY *et al.*, 2003).

Alguns aspectos favorecem o uso dos embriões de aves como modelo de estudo em toxicologia: (1) os ovos são do tipo megalécito (dispondo de reservas nutricionais e não dependendo do ambiente externo ou organismo materno para o desenvolvimento ocorrer); (2) apresentam membranas envoltórias resistentes; (3) o tempo total de desenvolvimento é curto (21 dias); (4) os embriões desenvolvem-se na ausência do organismo materno e na região superior do ovo permitindo que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado diariamente em laboratório (SCHOENWOLF, 1999) e, (5) seu desenvolvimento é muito bem documentado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Tais características fazem do embrião de ave um excelente modelo para avaliar os efeitos de agentes estranhos (químicos ou biológicos) sobre o desenvolvimento embrionário, e dependendo dos estágios avaliados importantes relações podem ser consideradas com mamíferos.

Nas aves, as fases do desenvolvimento embrionário correspondentes à clivagem e blástula precedem a postura dos ovos. Nesse momento, o embrião se

encontra no estágio de blastoderma, estrutura discoidal constituída por duas camadas, o epiblasto e o hipoblasto (GILBERT, 2001). A embriogênese só prosseguirá, em ambiente natural ou experimental, se existirem condições favoráveis à expressão gênica e fenotípica do programa de morfogênese e organogênese estabelecidos para a espécie (WOLPERT, 2000).

A espécie de ave mais utilizada em estudos de laboratório é a galinha (*Gallus gallus domesticus*), por ser barato com desenvolvimento de curto prazo, sendo necessário incubar os ovos por um período de 21 dias, em temperatura de 38°C, oxigenação e umidade apropriadas para que a eclosão possa ocorrer (GONZALES, 1994; DIAS, 1996). A relação entre o aparecimento de estruturas embrionárias com o tempo de desenvolvimento está definida e organizada em estágios (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) (HH), o que permite acompanhar as rápidas transformações embrionárias que não poderiam ser registradas apenas em função do dia de desenvolvimento. Assim, o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário nos permite acompanhar a organização estrutural básica do embrião.

Diversas substâncias podem agir sobre os mecanismos da embriogênese, alterando o padrão normal da espécie (NARBAITZ, 1985; ANWER et al., 1988; VODELA et al., 1997; DIAS; MÜLLER, 1999; HEATON; BRADLEY, 1995; CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003). A mortalidade é o último biomarcador dos efeitos tóxicos, que indica a ação letal de um agente estranho (químico, alternativo ou biológico). As anormalidades entre embriões podem ser usadas para indicar o potencial teratogênico dos agentes estranhos (WALTERS et al., 1987; CHO; LEE, 1990; HEINRICH-HIRSCH et al., 1990), e as medidas do embrião, saco vitelínico ou peso dos órgãos indicam se um agente estranho interfere com o crescimento (MAYER et al., 1992).

O presente trabalho utilizou o embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus*) como modelo para avaliar os efeitos tóxicos do OE *Melaleuca alternifolia* utilizado como agente de controle alternativo, em comparação com produto fungicida sintético (a base de Iprodiona).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 200 (duzentos) ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*, adquiridos (com recursos particulares) em empresa da região. Inicialmente 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 antes de serem iniciados, foram submetidos à avaliação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais - UTFPR.

Esses ovos fertilizados já contém o embrião na fase de blástula no momento da postura pela fêmea. O desenvolvimento embrionário permanece paralisado desde esse momento da postura até que esse ovo seja submetido às condições ideais (incubação à 37,5° C com umidade e ventilação constantes).

#### 3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental foi dividido em 5 grupos (Tabela 1). Onde foram utilizados 40 ovos para cada grupo experimental, totalizando 200 ovos.

Por questões de praticidade na execução, o experimento foi dividido em 4 (quatro) etapas com 10 (dez) ovos de cada grupo, totalizando 50 ovos por etapa.

Tabela 1 - Grupos experimentais. Fonte: autoria própria.

Grupos experimentais	Ovos	Quantidade
<b>(1) Grupo Controle Fechado</b>	Não injetados	40
<b>(2) Grupo Veículo I</b>	Injetados com 100 µL de solução de *Tween 80® a 0,01 % em água destilada.	40
<b>(3) Grupo Veículo II</b>	Injetados com 100 µL de solução de Tween 80® a 1 % em água destilada.	40
<b>(4) Grupo OE árvore-do-chá (<i>Melaleuca alternifolia</i>)</b>	Injetados com 100 µL de solução de óleo essencial de árvore-do-chá ( <i>Melaleuca alternifolia</i> ) **500 µg/mL em Tween 80® a 0,1 % soro fisiológico	40
<b>(5) Grupo produto sintético (a base de iprodiona)</b>	Injetados com 100µL de solução de Produto Fitossanitário Sintético (PFS) - fungicida a base de iprodiona a 0,0015 %, mofo cinzento ( <i>Botrytis cinerea</i> ) ( <i>Fragaria spp.</i> ) [150 mL p.c./100L água]	40

\* é um co-emulsificador de óleo em água

\*\*concentração mínima inibitória para fungo *Botrytis cinerea*, cujos resultados foram obtidos previamente pela doutoranda Lilian de Souza Vismara.

### 3.2 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

Os embriões foram expostos às diferentes soluções, no tempo E0 (para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente natural, no qual a fêmea seria exposta aos agentes de controle alternativo e, ao colocar o ovo, este já conteria o OE *Melaleuca alternifolia* no seu interior), através de injeção das soluções descritas na Tabela 1. Com uma agulha mais espessa é feita uma perfuração na casca do ovo (Figura 2 - A), onde está localizada a câmara de ar (Figura 1), local que permite melhor dispersão dos agentes sobre o embrião (YAMAMOTO et al., 2012). Com uma seringa para insulina (Figura 2 – B), foram injetados cada um dos tratamentos (Tabela 1).

Figura 1 - Desenho esquemático do ovo de *Gallus gallus*. A: Indicação de suas partes. Fonte: Expedição Vida. B: Injeção do contaminante na câmara de ar do ovo de *Gallus gallus*.

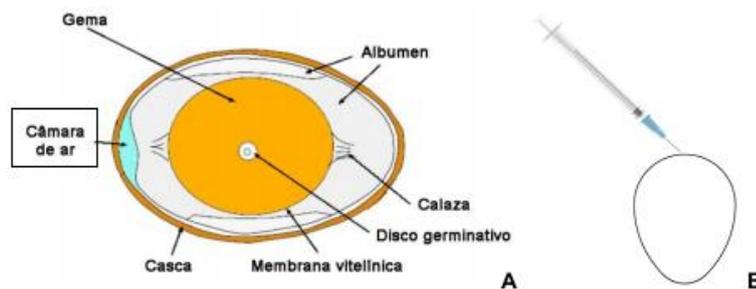


Figura 2 – aplicação dos tratamentos. A = perfuração com agulha mais grossa; B = injeção com seringa de insulina. Fonte: Autoria própria (2019).



Após a injeção, com os respectivos tratamentos, os ovos foram selados com fita adesiva (Figura 3 – A), posicionados com a câmara de ar voltada para cima e

incubados por 3 (três) dias em incubadora (Figura 3 – B), que foi construída sob encomenda por Adenilson de Oliveira, profissional técnico capacitado, sob temperatura controlada a 37,5°C com umidade e ventilação constantes.

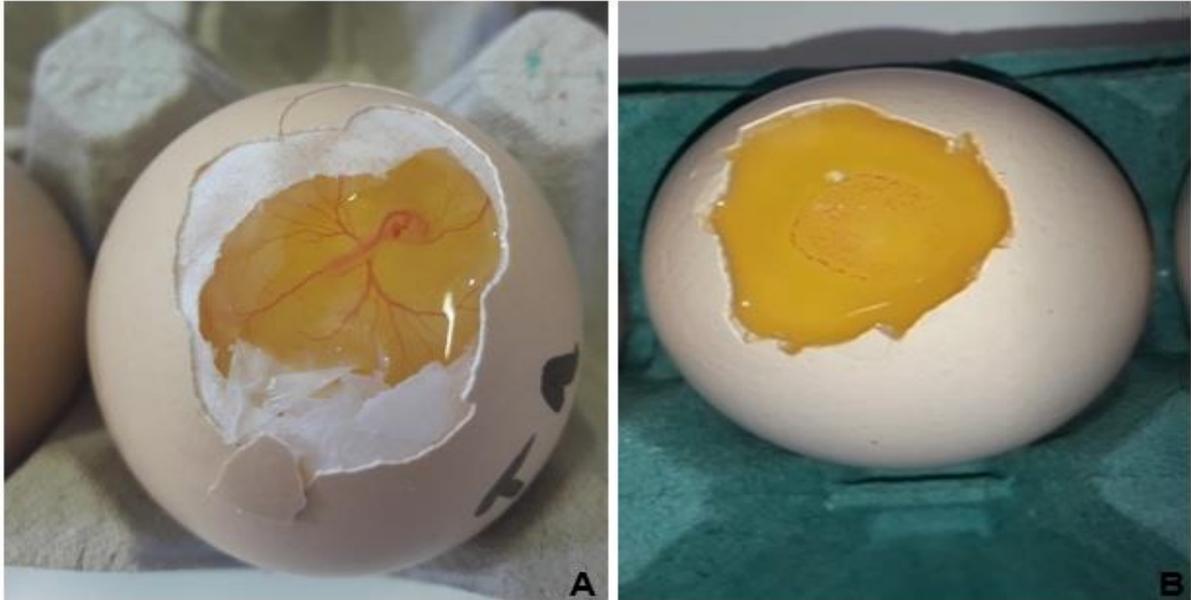
Figura 3 – pós injeção. A = selamento com fita adesiva; B = transferência para incubadora. Fonte: Autoria própria (2019).



### 3.3 AVALIAÇÕES DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

No terceiro dia de incubação já é possível observar o embrião com vasos sanguíneos e batimento cardíaco. Após a abertura do ovo, antes da eutanásia, foi avaliada a frequência cardíaca dos embriões. Foram observados os que possuíam batimentos cardíacos, os quais foram contabilizados como vivos (Figura 4 – A), e os que possuíam evidências de retomada do desenvolvimento, mas que não possuíam batimentos cardíacos, os quais foram contabilizados como mortos (Figura 4 – B). Os ovos que continham embriões mortos, foram descartados. Enquanto que os que continham embriões vivos, estes foram destinados à análise morfológica, conforme descrito no próximo item 3.4. Além disto, em alguns ovos não havia indícios de que o embrião tivesse retomado o desenvolvimento, estes foram classificados como inviáveis, os quais também foram descartados.

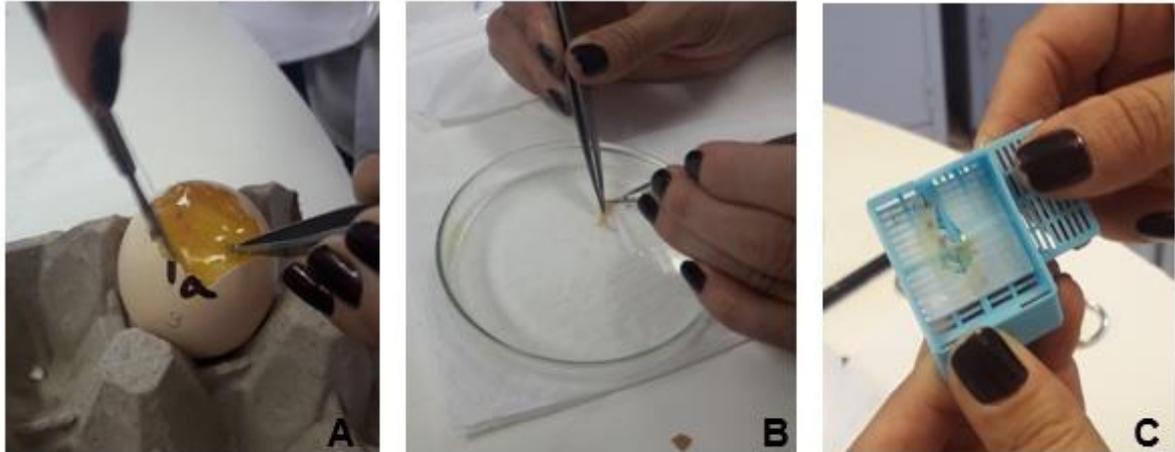
Figura 4 – Ovos com embrião vivo e morto. A = embrião vivo; B = embrião morto. Fonte: autoria própria (2019).



### 3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Os embriões classificados como vivos foram submetidos a eutanásia 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 através da técnica de montagem total (adaptado de ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Com o auxílio de pinça reta e tesoura ponta fina (Figura 5 – A), o embrião foi retirado do ovo e transferido para uma placa de Petri® contendo solução salina, onde foi lavado e o excesso de vitelo removido (Figura 5 – B). Em seguida um papel filtro retangular com um recorte em losango na região central foi encaixado sobre o embrião para mantê-lo distendido. Na sequência, foi gotejada solução fixadora de Carnoy (100 mL de ácido acético glacial com 300 mL de etanol 100 %). Os embriões então, foram transferidos para uma caixa plástica para processamento histológico do tipo cassete (Figura 5 – C) e fixados em Carnoy, por 2 horas, a temperatura ambiente, em frasco fechado. Depois, foram lavados em água destilada e colocados em álcool etílico 70 %, onde permaneceram por, no mínimo, 8 horas.

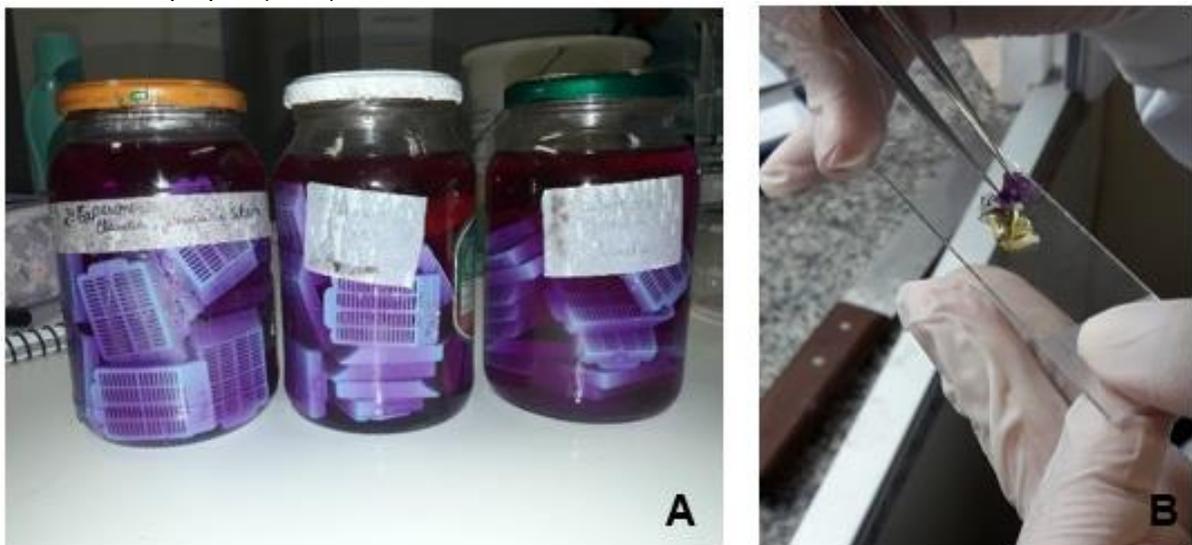
Figura 5 – Prática da metodologia. A = recorte envolta do embrião; B = tirando o excesso de vitelo; C = embrião colocado no papel filtro e transferido para cassete. Fonte: autoria própria (2019).



Então, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e corados com solução corante Carmalúmen de Mayer, por 48 horas. Após a coloração, estes foram desidratados em série crescente de álcool etílico e diafanizados com dois banhos de xilol. Para a montagem das lâminas permanentes, foram utilizados o bálsamo do Canadá e lamínula.

A análise e registro fotográfico foi realizada em estereomicroscópio Zein modelo S temi 305 transmitida pelo programa Zen 2.3 lit com câmera AxioCam ERc 5s, foram analisadas as malformações e estágios do embrião de acordo com a descrição de HAMBURGER; HAMILTON (1951).

Figura 6 – Prática da metodologia. A = embriões em solução para coloração; B = montagem de lâmina. Fonte: autoria própria (2019).



#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

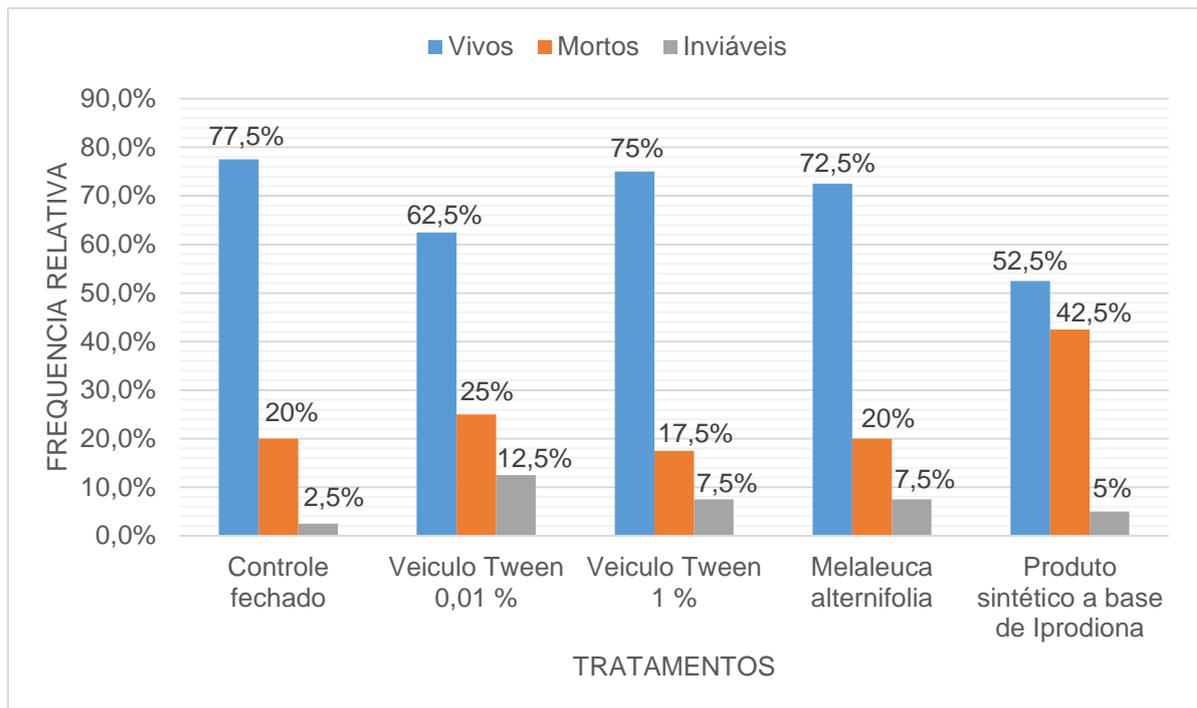
Após os embriões serem expostos as soluções (tabela 1) e incubados a temperatura controlada de 37,5 °C, com ventilação e umidade constantes, durante 3 dias, foi feita a coleta para análise dos mesmos. Com setenta e duas horas de incubação, já é possível observar o embrião com vasos sanguíneos e batimento cardíaco.

Foi quebrada a casca dos ovos na parte onde se encontra a câmara de ar e verificado se o embrião apresentava batimentos cardíacos. Estes foram contabilizados como vivo, enquanto que os sem batimentos cardíacos ou com foram contabilizados como mortos, e os ovos que não possuíam embrião foram contabilizados como inviáveis. Ovos com embriões mortos ou inviáveis foram descartados.

Os embriões que estavam vivos foram submetidos a eutanásia segundo as normas do CONCEA (2013), em seguida feita a coleta e este submetido a todas as etapas propostas na metodologia. Durante o processo de coleta do embrião ocorreram alguns imprevistos, como por exemplo perder o embrião em meio ao vitelo não sendo possível encontra-lo. Os embriões montados nas laminas foram analisados em estereomicroscópio.

Através da porcentagem de mortalidade foi possível observar que apenas os grupos controle fechado (ovos que não foram expostos a tratamentos) e tratados com Tween 80<sup>®</sup> a 1 % apresentaram taxa de embriões vivos mais próximo do esperado (80 % a 90 %) valor repassado pela empresa fornecedora dos ovos. O grupo que recebeu o produto fungicida sintético obteve a maior taxa de mortalidade. Um resultado curioso e pouco esperado foi aquele encontrado com Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 %, com taxas de mortalidade de 25 % e de inviabilidade de 12,5 % (Gráfico 1).

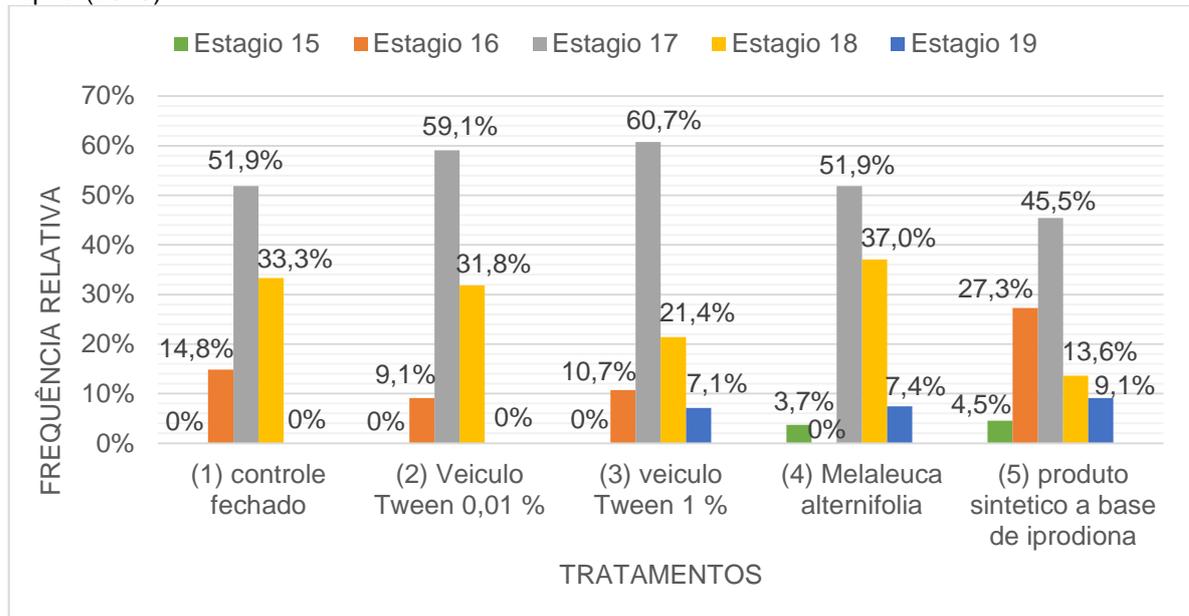
Gráfico 1 – demonstração da viabilidade dos grupos experimentais. Fonte: autoria própria (2019)



Em relação aos estágios de desenvolvimento em que se encontravam os embriões vivos (Gráfico 2), foram observados cinco diferentes estágios (15, 16, 17, 18 e 19), sendo o estágio 17 (Figura 7 - A) predominante, seguido do estágio 18 (Figura 7 - B).

Para a determinação dos estágios, foram levados em consideração principalmente a contagem do número de somitos, o tamanho dos brotos das asas e das pernas, além do tamanho e curvatura da cauda, segundo Hamburger e Hamilton (1951). Interessante salientar que, os embriões tratados com o fungicida sintético apresentaram a maior diversidade de estágios, e diferentemente dos demais grupos, apresentou a maior quantidade de embriões nos estágios 16 a 19.

Gráfico 2 –demonstração da frequência dos estágios de desenvolvimento dos embriões. Fonte: autoria própria (2019)



Já na comparação entre embriões que continham ou não malformações (Tabela 2), o tratamento com produto sintético a base de Iprodiona foi o que mais apresentou embriões malformados (27 %), seguido do grupo veículo Tween a 0,01 %, com 24 %. O grupo veículo Tween a 1 % apresentou-se igualmente ao grupo do OE de *Melaleuca alternifolia*, ambos com 18 % de embriões malformados.

As malformações encontradas foram as seguintes: gastrosquise (falha no fechamento lateral do corpo) (Figura 8 – A), atrofia caudal (Figura 8 – B), agenesia caudal (Figura 8 – D), defeito de tubo neural na região encefálica (o que acarretaria em anencefalia) (Figura 8 – G), cabeça bífida (Figura 8 – E), disgenesia craniofacial (Figura 8 – C) e duplicação do par de olhos (Figura 8 – F). No tratamento com óleo de *Melaleuca alternifolia* ainda foram observados dois embriões com malformações severas (Figura 8 – H), que impossibilitou a determinação do estágio do desenvolvimento.

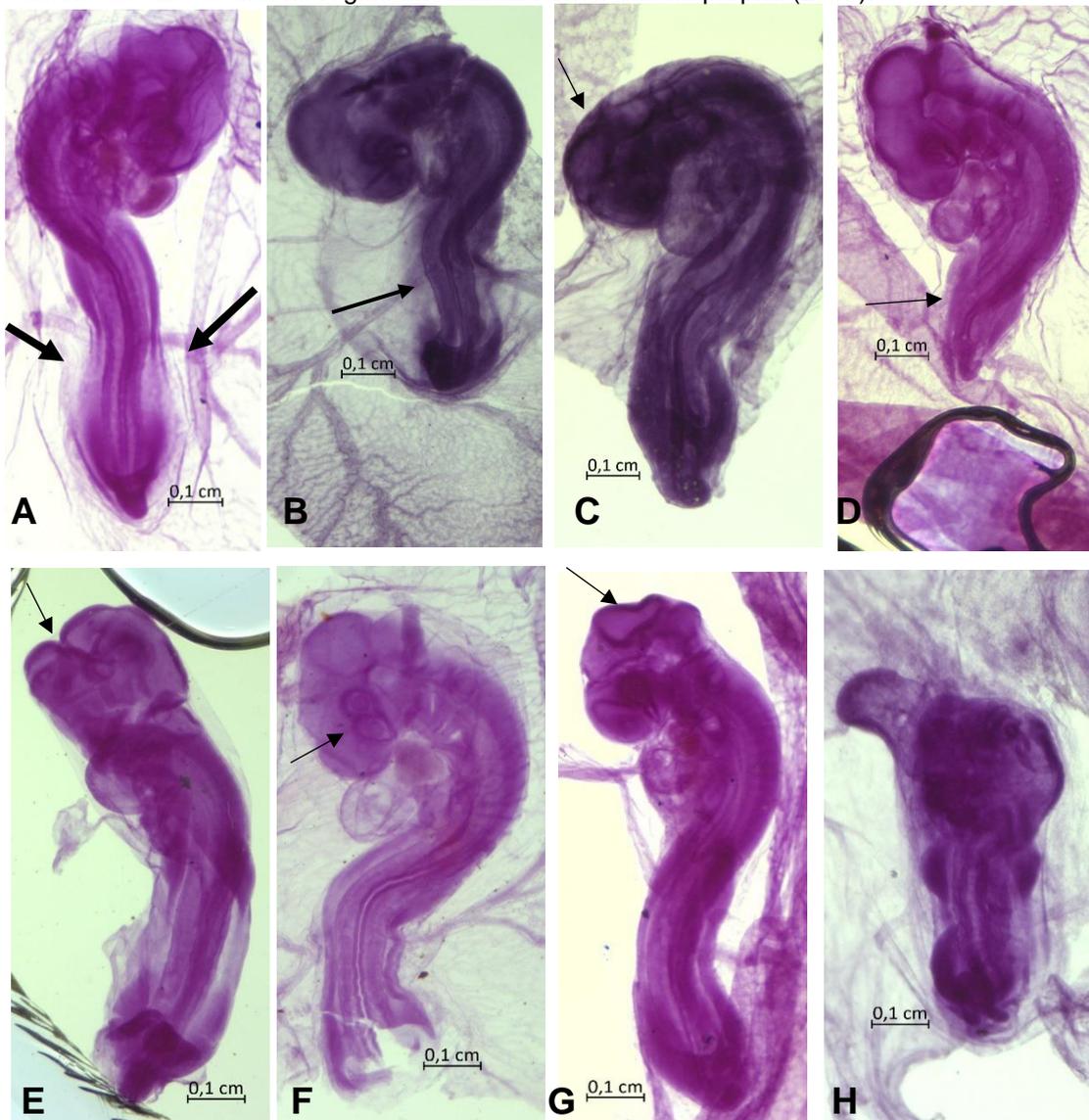
Tabela 2 – comparação do número de embriões normais e malformados dentre aqueles que estavam vivos no momento da abertura do ovo. Fonte: Autoria própria (2019)

Tratamentos	Normal	Malformados	Total (100 %)
(1) controle fechado	26 (96 %)	1 (4 %)	27
(2) Veículo Tween 80® a 0,01 %	19 (68 %)	6 (24 %)	25
(3) veículo Tween 80® a 1 %	25 (82 %)	3 (18 %)	28
(4) <i>Melaleuca alternifolia</i>	23 (82 %)	5 (18 %)	28
(5) produto sintético a base de Iprodiona	16 (73 %)	6 (27 %)	22

Figura 7– Embriões de ave preparados por montagem total. A= embrião normal estágio 17; B= embrião normal estágio 18. Fonte: autoria própria (2019)



Figura 8 – Embriões de ave malformados preparados por montagem total. A = Gastrosquise; B = atrofia caudal; C = Disgenesia craniofacial; D = Agenesia caudal; E = cabeça bífida; F = Duplicação do olho; G = defeito de tubo neural na região encefálica. Fonte: autoria própria (2019).



Embora tenham sido registradas taxas de mortalidade (20 %) e de malformações (4 %) também no grupo sem tratamento, é importante salientar que o erro é inerente ao desenvolvimento embrionário de qualquer espécie (CARLSON, B.M. 1996).

Os óleos essenciais extraídos de plantas convencionalmente são muito utilizados tanto oralmente como externamente como antioxidante, antibacteriano, antifúngico entre outros (AYSEGUL G. et al. 2015). Porém não há muitos estudos relacionados ao assunto de óleos sobre o efeito embriotoxicológico em embrião de galinha.

Em comparação com outros tipos de trabalhos feitos sobre os efeitos ocasionados com *Melaleuca* podemos observar que ela pode ser prejudicial. Em experimento feito com extrato das folhas da *Melaleuca* com várias concentrações diferentes aplicado sobre sementes de *Brachiaria brizantha* (espécie forrageira) para observar o efeito que ocasiona na germinação, nos resultados obtidos observaram que a partir da utilização de 10 % do extrato em comparação com o grupo controle (que não foi utilizado o extrato) houve a grande diminuição na germinação das sementes, contudo a *Melaleuca* interferiu na germinação das sementes QUEIROZ, R. L. et al. . (2016).

Outro estudo com efeito do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no processo de reparo de alvéolos dentais infectados em ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) foi extraído os dentes e posterior infecção do alvéolo com *Staphylococcus aureus*, foi feita irrigação com concentração de 20 % do óleo *Melaleuca*, após o tratamento os animais foram sacrificados para a análise, o qual causou retardo no reparo do alvéolo demonstrado por maior área de necrose (morte da célula ou do tecido) e menor osteogênese (formação do osso novo) (KREUGER; OROFINO, M.R. et al. 2007).

Já o Tween 80<sup>®</sup> é um produto que serve para a dissolução do óleo para haja melhor absorção pelo embrião durante o seu desenvolvimento, mas para sabermos se o óleo causa algum tipo de toxicidade aos organismos foi necessário fazer testes com o Tween 80<sup>®</sup> para sabermos se o mesmo não causava algum tipo de alteração nos tratamentos de interesse.

Outro trabalho realizado por meio de bioensaio de tratamentos com extratos contendo o Tween 80<sup>®</sup>, somente com Tween 80<sup>®</sup>, e somente com água destilada

sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Marisa AG216). No qual nos resultados obtidos todos os extratos contendo o Tween 80<sup>®</sup>, e o produto surfactante Tween 80<sup>®</sup>, provocaram inibição do crescimento de radículas de plântulas de alface, com redução de comprimento de raiz, e de hipocótilo em comparação com o tratamento contendo apenas água destilada. Em vista que o Tween 80<sup>®</sup> teve resultado negativo, pode-se inferir que os efeitos inibitórios de todos os extratos sobre o comprimento de radícula e dos extratos das espécies daninhas sobre o crescimento do hipocótilo tenham sido acrescidos pelo surfactante (SANTOS, C. C. *et al.* 2003).

Referente ao Iprodiona segundo ARCAIN, B. M. S. (2017) realizou experimentos em embrião de galinha em contato com concentrações mais elevadas de Iprodiona do que a indicada pelo fabricante até chegar a dose letal, em seus resultados houve uma quantidade significativa de malformados e que continham hemorragias, mas nos experimentos antes de chegar a dose letal os embriões que morriam eram de três a seis dias e os que sobreviveram acompanharam o desenvolvimento do grupo controle o qual não alteração significativa.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- Todos os tratamentos testados perturbaram o desenvolvimento normal do embrião;
- O produto fitossanitário sintético (a base de Iprodiona) foi o mais tóxico para os embriões, dadas as taxas de mortalidade e malformações observadas, assim como a mais ampla variação de estágios encontrados;
- O OE de *M. alternifolia* aparentemente não induz malformações in vivo que o tween possa ter sido o responsável pela alteração no resultado, e nem altera as taxas de mortalidade, embora não tenha sido possível mensurar exatamente seu potencial tóxico, visto que os dados obtidos com o OE foram muito próximos daqueles com o veículo (Tween 80) na concentração de 1 %;
- A menor concentração do veículo (0,01 %) foi mais prejudicial ao desenvolvimento embrionário do que a maior concentração (1 %) e o OE;
- Outras análises devem ser consideradas para trabalhos futuros, como por exemplo a análise estatística e o teste de outras moléculas tensoativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. Agricultura Tropical Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas, Brasília DF. Embrapa, 2008.

ANWER, J.; ALI, S.; MEHOTRA, N. K. Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. **Drug Chemical Toxicology**, 11 (1): 85-95, 1988.

ARCAIN, B. M. S. **Efeito do iprodiona (rovral®) no desenvolvimento de *Gallus gallus***. Instituto latino-americano de ciências da vida e da natureza (ilacvn) 2017.

AYSEGUL G. et al. **Investigation of Effects of Essential Oil from Berries of *Juniperus excelsa* Bieb. Subsp. *excelsa* (Cupressaceae) on Angiogenesis in Shell-less Chick Embryo (CAM) Culture**. Journal of Essential Oil Bearing Plants, ISSN: 0972-060X (Print) 0976-5026 (Online) Journal home page: <https://www.tandfonline.com/loi/teop202015>

BARBOSA; PAULA *et al.* **CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE)** Quim. Nova, Vol. 27, 2004.

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.

BETTIOL, W. **Controle alternativo**, ageitec, Brasília DF, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_23\\_299200692526.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html)>

BRUM, R. B. C. S. **Efeitos de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Federal do Tocantins, 2012.

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

CARVALHO, M.S.L. **Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, com ênfase na Morfologia e organização das células Microgliais do telencéfalo**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

CAVALARI; OLIVEIRA. **Óleo essencial de melaleuca**. Revista Saúde em Foco – Edição nº 9. Pg. 582– Ano: 2017. Disponível em > [http://www.unifia.edu.br/revista\\_eletronica/revistas/saude\\_foco/artigos/ano2017/065\\_essencialdemelaleuca.pdf](http://www.unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/saude_foco/artigos/ano2017/065_essencialdemelaleuca.pdf) acesso: 24/06/2019 as 11:47

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.

CARLSON, B.M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Editora Guanabara koogaan S.A. Rio de Janeiro, 1996.

CONCEA - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**, 2013.

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

DECRETO nº 6.323. **Produção orgânica no Brasil** de 27 de dezembro de 2007.

DIAS, P.F.; MÜLLER, Y.M.R. Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*. **Revista Brasileira de Biologia**, 59 (2): 343-350, 1999. EXPEDIÇÃO VIDA.

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 30/04/2018.

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.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer, 749p., 2001.

GONZALES, E. Embriologia e Desenvolvimento Embrionário. In: **APINCO. Manejo da Incubação**. São Paulo, 1994.

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

HEATON, M. B.; BRADLEY, D. M. **Ethanol influences on the chick embryo spinal cord motor system: analyses of motoneuron cell death, motility, and target trophic factor activity and in vitro analyses of neurotoxicity and trophic factor neuroprotection**. *Journal of Neurobiology*, 26 (1), 1995.

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.

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

HENSHEL, D.S.; HEHN, B.; WAGEY, R.; VO, M.; STEEVES, J.D. The relative sensitivity of chicken embryos to yolk- or air-cell-injected 2, 3, 7, 8,- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Environmental toxicology and chemistry**, 16(4), pp. 725-732, 1997.

KREUGER; OROFINO, M.R. et al. **Influência do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na cicatrização de alveolite dental infectada: um estudo histológico em ratos.** *Rev. bras. farmacogn.*, vol.17, n.3, pp.349-355. ISSN 0102-695X.. 2007.

VISMARA. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos cv. Caminho real ao mofo cinzento na pós-colheita, sobre o *Botrytis cinérea* in vivo e em bioensaio de toxicidade.** Tese apresentada em programa de Pós-graduação em Agronomia. Pato Branco – PR. Tese não publicada, 2019.

BRASIL. Decreto federal nº 7.802, **Presidência da República Casa Civil**, 11 de julho de 1989, disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)>

LORENZETTI, E.R; *et al.* **Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinere* isolado de morangueiro**, *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.13, especial, p.619-627, dezembro de 2011.

NARBAITZ, R.; MARINO, I.; SARKAR, K. Lead-induced early lesions in the brain of the chick embryo. **Teratology**, 32:389-396, 1985.

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.

MATTSON, A. et al. Metabolic Profiling of Chicken Embryos Exposed to Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Agonists to Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0143780 1-20, 2015.

MAYER, F.L.; VERSTEEG, D.J.; MCKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANEY, R.L.; MCCUME, D.C.; RATTNER, B.A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. and Bergman, H.L. (Eds.), **Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.** **Society of Environmental Toxicology and Chemistry**, Lewis Publishers, Colorado, 1992.

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

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.

OOTANI ET AL., 2011; CASTRO ET AL., 2010 apud BRUM, S. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**, Gurupi-TO, janeiro de 2012.

PEREIRA, C.G.L. **controle fitossanitário: agrotóxicos e outros métodos**, Câmara dos Deputados Consultoria Legislativa Anexo III - Térreo Brasília – DF 2013.

POWELL, D.C.; AULERICH, R.J.; STROMBORG, K.L.; BURSIA, S.J. **Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the developing chicken embryo when injected prior to incubation.** *Journal of Toxicology and Environmental Health* 49 319-338, 1996.

QUEIROZ, R. L. *et al.* **Avaliação de extrato de *Melaleuca alternifolia* (Cheel) na germinação de *Brachiaria brizantha*.** *Revista fitos*, Capa > v. 10, n. 4 (2016).

ROMERO, A. R. **Meio ambiente e dinâmica de inovações na agricultura.** São Paulo: Annablume, FAPESP: 2007.

SANTOS, C. C. *et al.* **Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante tween 80, na germinação e crescimento de plântulas de alface.** *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 28, n. 2, p. 296-299, mar. /abr., 2004

SANTOS, *et al.* **Ocorrência do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em grevilea.** TPP 7096 Editor Associado: Robert W. Barreto, 28 Julho 2008. Disponível em ><http://www.scielo.br/pdf/cagro/v28n2/a07.pdf>.

SCHATZ, J.C. **Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula.** Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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.

SIMÕES, R. P. *et al.* **Efeitos do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica.** *Lecta*, Bragança 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.

SILVA, G.B.O **processo histórico da modernização da agricultura no brasil (1960-1979)** CAMPO-TERRITÓRIO: revista de geografia agrária, v. 9, n. 17, p. 362-387, abr., 2014.

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

SOUSA; S. B.; FURTADO, **Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos no estado de Alagoas, Brasil,** *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2012.

VODELA, J. K.; LENZ, S. D.; RENDEN, J. A.; MCELHENNEY, W. H.; KEMPPAINEN, B. W. **Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene and trichloroethylene). 2. Effects on reproductive performance, egg quality, and embryo toxicity in broiler breeders.** Poultry Science, 76: 1493-1500, 1997.

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.

YAMAMOTO, F. O.; NETO, F. F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effect on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.