

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MARCELI HOFMA LOPES

TOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Ricinus communis* L. A *Apis mellifera* L. E *Gallus gallus domesticus* L.

DOIS VIZINHOS

2023

JULIANA MARCELI HOFMA LOPES

TOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Ricinus communis* L. A *Apis mellifera* L. E *Gallus gallus domesticus* L.

Toxicity of the hexanic fraction of fruits and seeds of *Ricinus communis* L. *Apis mellifera* L. and *Gallus gallus domesticus* L.

Trabalho de conclusão de Dissertação apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas pelo Programa de Pós-Graduação em agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Michele Potrich.

Coorientador(a): Everton Ricard Lozano da Silva.

Coorientador(a): Patrícia Franchi de Freitas.

DOIS VIZINHOS

2023



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

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



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



JULIANA MARCELI HOFMA LOPES

**TOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE RICINUS COMMUNIS L. A APIS
MELLIFERA L. E GALLUS GALLUS DOMESTICUS L.**

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

Data de aprovação: 28 de Fevereiro de 2023

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

Dr. Geraldo Andrade Carvalho, Doutorado - Universidade Federal de Lavras (Ufla)

Dra. Nedia De Castilhos Ghisi, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

Dedico este trabalho à pessoa que mais me incentivou a nunca desistir dos estudos,
minha querida e amada Vó

AGRADECIMENTOS

A única certeza que tenho escrevendo estes agradecimentos é que irei esquecer de alguém, agradeço de forma geral a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho, peço perdão a aqueles que não mencionei, saibam que no meu coração não os esquecerei.

Primeiramente agradeço à minha namorada, por todas as noites que passou ao meu lado, e por todas as viagens que fez comigo neste período; à minha família, por todo apoio e incentivo durante todo esse período, à minha amiga Bruna, por toda compreensão e auxílio, à minha psicóloga, sem ela não teria finalizado esta etapa da minha vida. Saibam que todos vocês têm parte fundamental na conclusão dessa dissertação.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Michele Potrich, por todo apoio, compreensão e por toda sabedoria, não poderia ter escolhido uma orientadora melhor pra me acompanhar nesta trajetória. Agradeço também a meus coorientadores, Professor Doutor Everton Ricard Lozano da Silva e Professora Doutora Pátircia Franchi de Freitas, sem vocês nada disso seria possível. À todos os professores e colegas de turma que passaram pela minha jornada na universidade, agradeço por todos os ensinamentos, vocês moldaram a profissional que me tornei.

Em especial aos professores e alunos dos laboratórios LABCON (Laboratório de Controle Biológico), BIOMOL (Laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular), e à Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura UNEPE – Apicultura, agradeço por todas as vivências compartilhadas.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), cujo projeto de dissertação está inscrito no CNPq 313244/2020-0, agradeço por todo o suporte e pela oportunidade de me tornar mestra por esta universidade.

Por fim, gostaria de agradecer à Deus, por confiar em mim essa missão.

Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses
(RUBEM ALVES).

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da fração hexânica de frutos e sementes de *Ricinus communis* (FHFSRc) sobre *Apis mellifera* (abelha africanizada) e *Gallus gallus domesticus* (galinha doméstica). Foram avaliadas três concentrações da FHFSRc, sendo elas, 1%, 1,5% e 2%, além de dois tratamentos controles, sendo um controle com água destilada e um controle com Tween 80® (0,01%). A FHFSRc foi avaliada sobre *A. mellifera* através de três diferentes bioensaios, o Bioensaio 1 – Contato de operárias com superfície contaminada com FHFSRc; Bioensaio 2 - Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de *A. mellifera* e; Bioensaio 3 - teste de voo (deslocamento vertical). As avaliações de sobrevivência de *A. mellifera* nos bioensaios 1 e 2 ocorreram após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas sendo contabilizado o número de abelhas mortas em cada horário. Depois de 24 horas as abelhas do bioensaio 3 foram submetidas ao teste de deslocamento vertical. Após a análise dos resultados obtidos nos bioensaios 1 e 2, verificou-se que a exposição de operárias de *A. mellifera* ao FHFSRc, independentemente da concentração ou forma de exposição utilizada, ocasionou redução na probabilidade de sobrevivência, bem como, a FHFSRc alterou o deslocamento vertical de *A. mellifera*. A FHFSRc foi analisada sobre embriões de *G. gallus domesticus* em duas formas diferentes de exposição: i) injeção dos tratamentos na câmara de ar do ovo e ii) pulverização dos tratamentos sobre o ovo. Os ovos de *G. gallus domesticus*, após os três dias de incubação, foram coletados para análise morfológica através da técnica de montagem total. Após a análise, observou-se que a exposição destes a FHFSRc, independentemente da concentração ou forma de exposição utilizada, causou redução na probabilidade de sobrevivência de *G. gallus domesticus*, bem como, a FHFSRc causou malformações nos embriões de *G. gallus domesticus* quando injetada na câmara de ar. A FHFSRc é tóxica para operárias de *A. mellifera*, interferindo negativamente em seu deslocamento vertical, além de causar redução na probabilidade de sobrevivência. A FHFSRc também é tóxica para embriões de *G. gallus domesticus*, reduzindo sua probabilidade de sobrevivência tanto quando injetada na câmara de ar quanto quando pulverizada na casca do ovo, causando também malformações corporais em embriões de *G. gallus domesticus* quando injetados em sua câmara de ar.

Palavras-chave: Abelhas; Embrião de Ave, Ecotoxicologia, Inseticida de Mamona.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of the hexane fraction of fruits and seeds of *Ricinus communis* (FHFSRc) on *Apis mellifera* (Africanized bee) and *Gallus gallus domesticus* (domestic chicken). Three concentrations of FHFSRc were evaluated, namely, 1%, 1.5% and 2%, in addition to two control treatments, one with distilled water and one with Tween 80® (0.01%). FHFSRc was evaluated on *A. mellifera* through three different bioassays, Bioassay 1 – Contact of workers with a surface contaminated with FHFSRc; Bioassay 2 - Intake of diet containing FHFSRc by *A. mellifera* workers e; Bioassay 3 - flight test (vertical displacement). The survival evaluations of *A. mellifera* in bioassays 1 and 2 occurred after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 and 48 hours, counting the number of dead bees in each time. After 24 hours, the bees from bioassay 3 were submitted to the vertical displacement test. After analyzing the results obtained in bioassays 1 and 2, it was verified that the exposure of *A. mellifera* workers to FHFSRc, regardless of the concentration or form of exposure used, caused a reduction in the probability of survival, as well as, FHFSRc altered the vertical displacement of *A. mellifera*. FHFSRc was analyzed on *G. gallus domesticus* embryos in two different ways of exposure: i) injection of treatments into the air chamber of the egg and ii) spraying of treatments on the egg. The eggs of *G. gallus domesticus*, after three days of incubation, were collected for morphological analysis using the total mounting technique. After the analysis, it was observed that their exposure to FHFSRc, regardless of the concentration or form of exposure used, caused a reduction in the probability of survival of *G. gallus domesticus*, as well as, FHFSRc caused malformations in the embryos of *G. gallus domesticus* when injected into the air chamber. FHFSRc is toxic to *A. mellifera* workers, negatively interfering with their vertical displacement, in addition to causing a reduction in the probability of survival. FHFSRc is also toxic to *G. gallus domesticus* embryos, reducing their probability of survival both when injected into the air chamber and when sprayed on the eggshell, and also causing body malformations in *G. gallus domesticus* embryos when injected into their chamber. air.

Keywords: Bees; Bird Embryo, Ecotoxicology, Castor Bean Insecticide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Valor da Produção Agropecuária brasileira no ano de 2021.....	19
Figura 2: Favos de cria operculada de <i>Apis mellifera</i> produzidos no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV.....	36
Figura 3: Identificação da presença de ovos de um dia de <i>Apis mellifera</i> realizada no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV.....	36
Figura 4: Retirada dos quadros de <i>Apis mellifera</i> realizada no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV.....	37
Figura 5: Pulverização dos tratamentos à base de FHFSRc em placa de Petri.....	38
Figura 6: Processo de anestesia de operárias de <i>Apis mellifera</i> com CO ₂	38
Figura 7: Operárias de <i>Apis mellifera</i> em contato com superfície tratada com FHFSRc.....	39
Figura 8: Torre de voo para operárias de <i>Apis mellifera</i> utilizada no bioensaio 3, com a fonte de luz.....	41
Figura 9: ilustração dos estratos da torre de voo em relação ao deslocamento vertical de operarias de <i>Apis mellifera</i>	41
Figura 10: Injeção da FHFSRc na câmara de ar de ovos de <i>Gallus gallus domesticus</i>	57
Figura 11: Ovos de <i>G. gallus domesticus</i> com a câmara de ar voltada para cima na bandeja no interior da incubadora.....	57
Figura 12: Abertura da casca do ovo de <i>Gallus gallus domesticus</i> com visualização do embrião em desenvolvimento.....	58
Figura 13: Embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i> distendido e sobreposto ao retângulo de papel.....	58
Figura 14: Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> considerados normais. A) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 18; B) Embrião do T8 (pulverização de solução de Tween [®] 80 a 0,01) em estágio 17; C) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 17; D) Embrião do T9 (injeção de Solução de Tween [®] 80 a 0,01) em estágio 18; E) Embrião do T2 (pulverização de 1,5% da FHFSRC) em estágio 19; F) Embrião de do T1 (pulverização de 1% da FHFSRc) em estágio 17. Aumento final de 10x.....	66
Figura 15: Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações extensas. A) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 17; B) Embrião do T4 (injeção de 1% da FHFSRc);C) Embrião do T6 (injeção de 2% da FHFSRc); D) Embrião do T5 (injeção de FHFSRc 1,5%) ; E) Embrião do T1 (pulverização de 1% da FHFSRc); F) Embrião do T6 (injeção de 2% da FHFSRc). Objetiva de Aumento de 1x.....	67
Figura 16: Estereofotografia de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> com malformações na região corporal e caudal. A) Embrião do T3 (pulverização de 2% da FHFSRc) em estágio 18; B) Embrião do T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) estágio 17; C) Embrião T6 (injeção de 2% da FHFSRc) estágio 17; D) Embrião do T1 (pulverização de 1% da FHFSRc); E) Embrião do T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) Aumento final de 10x.....	68

Gráfico 1: Valor da Produção Agropecuária de 2011 a 2020, valores por setores em bilhões de reais.....	19
Gráfico 2: Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> após contado com superfície vítrea tratada com diferentes concentrações do FHFSRc de <i>R. communis</i>.....	42
Gráfico 3: Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> após serem alimentadas com diferentes concentrações do FHFSRc de <i>Ricinus communis</i>.....	43
Gráfico 4: Probabilidade de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> após contado com diferentes concentrações do FHFSRc de <i>Ricinus communis</i> em diferentes formas de exposição.....	44
Gráfico 5: Gráfico de plot representando o deslocamento vertical de <i>Apis mellifera</i> submetidas ao bioensaio 3.....	44
Gráfico 6: Viabilidade dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetidos as diferentes concentrações de FHFSRc.....	61
Gráfico 7: Probabilidade de sobrevivência dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc.....	62
Gráfico 8: Taxa de batimentos cardíacos dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc.....	63
Gráfico 9: Estágios do desenvolvimento dos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc.....	64
Gráfico 10: Probabilidade de ocorrência de malformação nos embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc.....	65
Quadro 1: Principais pragas de importância econômica de maior risco fitossanitário para as culturas agrícolas no Brasil segundo o MAPA.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos utilizados para avaliar a toxicidade de <i>Ricinus communis</i> a <i>Apis mellifera</i>	37
Tabela 2: Composição dos tratamentos e sua respectiva forma de exposição, utilizados para avaliar o efeito de <i>Ricinus communis</i> sobre a sobrevivência e morfometria em <i>Gallus gallus domesticus</i>	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
2.1 A agricultura e os agrotóxicos – um olhar grossistêmico	17
2.2 A relação entre os insetos e a agricultura	20
2.3 Os inseticidas botânicos	25
2.4 Fração hexânica de frutos e sementes de <i>Ricinus communis</i> L. (Malpighiales: Euphorbiaceae)	26
2.5 Aspectos biológicos de <i>Apis mellifera</i>	29
2.6 Aspectos biológicos do embrião de <i>Gallus gallus domesticus</i>	31
3. CAPÍTULO I – TOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE <i>Ricinus communis</i> L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE) A OPERÁRIAS DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA	33
3.1 Introdução	33
3.2 Material e métodos	35
3.2.1 Obtenção da Fração Hexânica de Folhas e Sementes de <i>Ricinus Communis</i> e obtenção de <i>Apis mellifera</i>	35
3.2.2 Bioensaio 1 – Contato de operárias com superfície contaminada com FHFSRc	37
3.2.3 Bioensaio 2 -Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de <i>A. mellifera</i>	39
3.2.4 Bioensaio 3 - teste de voo (deslocamento vertical)	39
3.3 análise estatística	41
3.4 Resultados	42
3.4.1 Bioensaio 1 – Contato de operárias de <i>A. mellifera</i> com superfície contaminada com FHFSRc	42
3.4.2 Bioensaio 2 -Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de <i>A. mellifera</i>	42
3.5 Discussão	45
3.6 Conclusão	51
4. CAPÍTULO II - <i>Gallus gallus domesticus</i> (GALLIFORMES: PHASIANIDAE) COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ANÁLISE DE BIOSSEGURANÇA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE <i>Ricinus communis</i> L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE)	52
4.1 Introdução	52
4.2 Material e métodos	54
4.2.1 Obtenção da FHFSRc e do embrião de <i>G. gallus domesticus</i>	54

4.2.2 Bioensaios com <i>G. gallus domesticus</i> e método de exposição	56
4.2.2.1 Análise da Viabilidade	57
4.2.2.2 Análise da Sobrevivência.....	58
4.2.2.3 Análise de Batimentos Cardíacos	58
4.2.2.4 Análise do desenvolvimento embrionário e análise morfológica.....	58
4.3 Análise estatística	59
4.4 Resultados.....	61
4.4.1 Análise de Viabilidade	61
4.4.2 Análise de sobrevivência.....	61
4.4.3 Análise de batimentos cardíacos	62
4.4.4 Análise do desenvolvimento embrionário e análise morfológica	63
4.5 Discussão	69
4.6 Conclusão.....	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, alcançando essa marca pela primeira vez em 2008, quando ultrapassou os Estados Unidos, entretanto, quando se considera o consumo relativo de defensivos agrícolas (Kg i.a/ha), o Brasil é o sexto país (API, 2021; MAIS SOJA, 2021; AGROLINK, 2023). Também em 2018 o Brasil consumiu 730 milhões de toneladas de agrotóxicos (CORNÉLIO et al., 2010). Dentre os 20 princípios ativos mais utilizados no Brasil, entre os anos de 2012 e 2016, sete são inseticidas (PIGNATI et al., 2017). Os inseticidas apresentam riscos ambientais, uma vez que sua toxicidade aos animais é alta (ALVARENGA; QUEIROZ; NADAE, 2017; DIBARTOLOMEIS et al., 2019; BOJARSKI, WITESKA, 2020; BELSKY, BIDDINGER, JOSHI, 2021; KAUR, SINGH, SINGH, 2022).

Uma medida que vem crescendo cada vez mais no mercado é o uso de produtos de origem natural, como os inseticidas botânicos, os quais apresentam potencial de controle ou de repelência de insetos-praga (ISMAN, 2020; YADAV; SINGH; YADAV, 2020; REES et al, 2021). Os inseticidas botânicos consistem nos produtos extraídos de plantas, sejam eles extraídos com água ou solventes orgânicos como álcool, acetona, clorofórmico éter, etc., ou o próprio material vegetal moído até ser reduzido a pó ((WIESBROOK, 2004). Esses compostos são derivados do metabolismo secundário, os quais produzem diversas substâncias que causam algum efeito e/ou repelem herbívoros e microrganismos, bem como, produzem moléculas sinalizadoras para atrair artrópodes polinizadores ou animais dispersores de sementes (PINTO et al., 2002). Os inseticidas botânicos são considerados como alternativas aos inseticidas químicos sintéticos pois, supostamente, representam menor ameaça a organismos não-alvo (ISMAN, 2006; AGATI et al., 2012). Outro ponto importante para o aumento da utilização de inseticidas botânicos é a popularização da produção orgânica. Portanto, pensando na necessidade eminente da utilização de práticas agrícolas de baixo impacto ambiental, a utilização desse tipo de inseticida vem a cada dia tendo maior importância econômica e socioambiental (SANTOS et al., 2013; MARTYNOV et al., 2019; GONÇALVES DINIZ et al., 2020; KIDANU, AZEREFEGNE, MENDESIL, 2021; ADOUANE et al., 2022).

Um dos inseticidas botânicos que vem ganhando destaque é a fração hexânica de frutos e sementes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), popularmente conhecido como mamona. Muitos estudos já provaram a eficácia da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* como inseticida, como exemplo a redução moderada, porém significativa, na emergência dos adultos de *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) e *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) (OVIEDO et al., 2018); outro exemplo é o controle do pulgão da cana-de-açúcar *Melanaphis sacchari* Zehrentner (Hemiptera: Aphididae) (SOTELO-LEYVA et al., 2020).

Apesar dos inseticidas botânicos serem considerados mais seguros ao ambiente quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos, é necessário investigar a sua toxicidade aos organismos não-alvo, uma vez que, nem todos os insetos são pragas e alguns inseticidas botânicos podem apresentar efeito tóxico também a organismos não alvo. Alguns insetos, inclusive, atuam no controle de outros insetos considerados praga, como os parasitoides e os predadores (PARRA, 2002). Além desses, quando se fala de organismos não-alvo, os polinizadores são os mais afetados pelos métodos de controle utilizados para insetos-praga (CARVALHO, PIVOTO, 2011; RIBEIRO, BARBARA, FERRO, 2017; ABATI, et al. 2021).

As abelhas são as principais representantes dentre os insetos polinizadores, sendo consideradas responsáveis pela polinização, tanto pela sua dispersão quanto pelo seu comportamento de forrageamento (OLIVEIRA, 2015; HUNG et al., 2018). Outro fator que agrega valor e importância às abelhas é a utilização dessas como produtoras de alimentos, como o mel ou a geleia real, e demais produtos utilizados pelo ser humano como o própolis ou a cera (PEREIRA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2019; YOGAPRIYA, USHARANI, SURESH, 2021).

Os vertebrados também são organismos diretamente afetados pelos métodos empregados para o controle de pragas na agricultura, mesmo estes não sendo os alvos dos produtos. Neste caso, os vertebrados podem sofrer inúmeras alterações morfológicas e fisiológicas quando em contato com estes produtos. Essas alterações podem estar ligadas a processos de alimentação e reprodução, impossibilitando a sobrevivência do animal afetado (OKY, PURNOMO, MULYONO, 2018; BAUNGRATZ et al, 2020; VIGAD et al, 2021).

Busca-se cada vez mais desenvolver produtos de origem natural, como inseticidas botânicos, com o objetivo de reduzir os riscos aos organismos não-alvo. Entretanto, sabe-se que os inseticidas botânicos, muitas vezes, não são seguros a estes. Assim, tendo em vista a importância dos organismos não-alvo aos agroecossistemas, faz-se necessário analisar a segurança de novos inseticidas botânicos antes da sua utilização deste em campo. Neste sentido, os organismos não-alvo *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e *Gallus gallus domesticus* L. 1758 (Galliformes: Phasianidae) são modelos biológicos adequados para avaliar a toxicidade da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* a invertebrados e vertebrados, respectivamente.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* a operárias de *A. mellifera* africanizada e a embriões de *G. gallus domesticus*, em laboratório.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a sobrevivência de operárias de *A. mellifera* quando submetidas a diferentes formas de exposição à fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*;
- Analisar a capacidade de voo de *A. mellifera* após a exposição às diferentes concentrações da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*;
- Avaliar a taxa de mortalidade e de anormalidades dos embriões de *G. gallus domesticus* com três dias de incubação, expostos à fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*;
- Avaliar morfológicamente, malformações anatômicas e histopatologia embrionária, após exposição do embrião de *G. gallus domesticus* durante o estágio inicial do desenvolvimento, à fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 A agricultura e os agrotóxicos – um olhar grossistêmico

"O termo agricultura vem do latim *agricultūra*, de *ager* 'campo' e *cultūra* 'cultivo' ou 'crescimento'. A agricultura é o conjunto de técnicas criadas para cultivar a terra a fim de obter produtos. Os primeiros registros de atividades agrícolas em solo brasileiro são de mais de 4 mil anos atrás. Os índios são considerados pioneiros do aproveitamento da terra para retirada de produtos, a fim de suprir a necessidade de seu povo. Quando os portugueses chegaram ao Brasil observaram as formas passivas de seleção de plantas utilizadas pelos povos indígenas, estas passadas de geração em geração durante milhares de anos. Logo após a chegada dos portugueses esses passaram a utilizar de mão de obra escrava para a implantação de sistemas monocultores. Então, o primeiro sistema monocultor implantado foi o de cana-de-açúcar, seguido, posteriormente, pela produção de café, sendo este o carro chefe da agricultura brasileira por um longo período (ALBUQUERQUE, SILVA, 2008; MIRANDA, 2020).

A partir da década de 50 a agricultura “moderna” passou a se inserir gradativamente no Brasil, a qual, proporcionou uma mudança significativa na agricultura, com a mecanização e industrialização dos processos agrícolas, trazendo mudanças também sociais e econômicas. O principal objetivo da implantação da agricultura moderna foi o aumento da produtividade da terra e do trabalho através da adoção de técnicas modernas de cultivo (BALSAN, 2006; PESSETTI, 2021). Devido ao aumento significativo de produção após a implantação da agricultura moderna, necessitou-se também implementar práticas novas de cuidados com a terra e com a produção, como a adubação e correção de nutrientes do solo, com o uso de fertilizantes e a utilização de tecnologias como maquinários, produtos químicos de controle de pragas, doenças e plantas invasoras, melhoramento genético, entre outros (ALBUQUERQUE e SILVA, 2008; MARTINEZ et al., 2017).

Entretanto, no decorrer dos anos, passou-se a discutir as consequências causadas pela utilização exagerada dos agrotóxicos na produção em massa, sejam eles os fungicidas, ou os utilizados para o controle de pragas, doenças e plantas invasoras. Esta prática pode acarretar em inúmeros danos ao ambiente, sendo os principais a seleção de populações de pragas e doenças resistentes aos produtos; a contaminação de

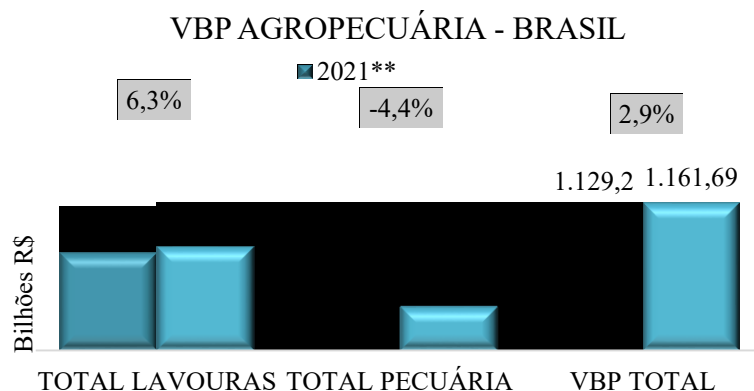
alimentos, água e ar; o esgotamento e perda de solos e a eliminação de inimigos naturais e insetos (BALSAN, 2006; GOULSON, et al., 2015; RÓDIO, ROSSET, BRANDALIZE, 2021).

O uso de agrotóxicos, ainda hoje, são amplamente difundidos pelo Brasil e pelo mundo. Quando se fala de produção agrícola em grande escala, ainda são fundamentais para o controle de pragas, doenças e plantas consideradas invasoras. Entretanto, muitas vezes, quando aplicado no ambiente causam danos a todos os níveis da cadeia trófica local, alterando a dinâmica natural e causando um desequilíbrio no agroecossistema (SPADOTTO, 2006; OLIVEIRA, 2021).

Estudos demonstram que, aproximadamente, 90% dos inseticidas químicos sintéticos são neurotóxicos, uma vez que sua ação ocorre pela danificação, destruição ou modificação do sistema nervoso dos insetos. Com a alteração causada ao sistema nervoso central, mesmo o menor contato possível resulta na morte do animal de forma, consideravelmente, rápida. Considerando a eficácia destes produtos ao objetivo proposto, a utilização desses na produção agrícola é a mais comum. Desse modo, autores associam muitas das desordens naturais, tais como, contaminação de solo, água, flora e fauna à contaminação direta ou indireta pelos inseticidas (VAN DER WERF, 1996; MAHMOOD, 2016).

O Valor da Produção Agropecuária (VBP) é o demonstrativo da evolução das lavouras e da pecuária no decorrer do ano anterior ao índice gerado. Este índice é calculado com base na produção agrícola e pecuária e nos preços recebidos pelos produtores nas principais praças do país. No ano de 2021, o VBP atingiu R\$ 1.129,2 bilhão, 10,1% acima do valor alcançado em 2020 que foi de R\$ 1.025,8 bilhão (Figura 1).

Figura 1: Valor da Produção Agropecuária brasileira no ano de 2021



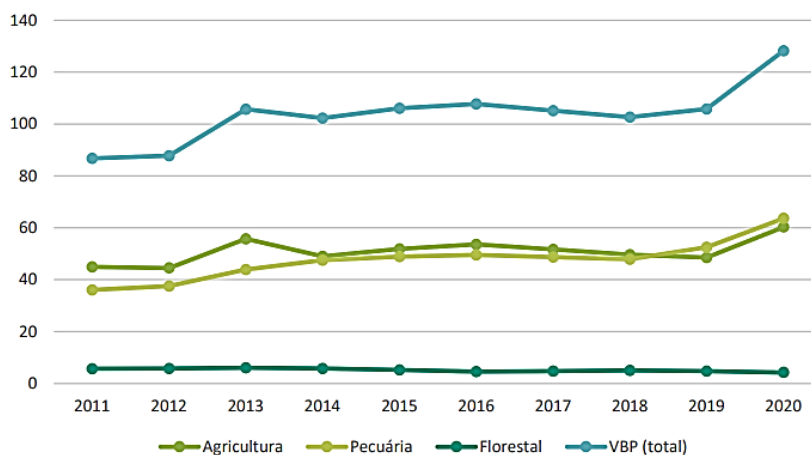
Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2022)

** Valor Preliminar com base em janeiro a dezembro/2021.

***3º prognóstico da safra de 2022 (algodão, amendoim, arroz, feijão, mamona, milho, soja e trigo, os demais produtos repetiu-se a safra de 2020). Pecuária considerou-se a produção dos últimos 4 Trimestres.

No estado do Paraná, no ano de 2020, o VBP chegou a 128 bilhões de reais. Valor é 21% maior que o valor obtido no ano anterior. Este valor foi recorde, superando o até então maior faturamento da série que havia sido registrado no ano de 2016 (Figura 2). Dada tamanha importância econômica da produção agropecuária à economia do estado e do país, torna-se indispensável o controle de quaisquer possíveis danos a estas, tais como as pragas no geral, destacando-se a relação intrínseca entre os insetos e a agricultura e portanto, a necessidade de controlar os danos causados por eles a esta.

Gráfico 1: Valor da Produção Agropecuária de 2011 a 2020, valores por setores em bilhões de reais



Fonte: Banco Central do Brasil, SEAB/DERAL (2022)

Segundo a SINDIVEG (2022) (Sindicato relacionado aos defensivos agrícolas), em 2020 houve 94 novos inseticidas biológicos registrados no Brasil, um aumento de 135% de registros comparado ao ano anterior, que teve 40 novos produtos biológicos.

2.2 A relação entre os insetos e a agricultura

Os insetos são os representantes da maior classe do Reino Animal, a classe Insecta. Estes, além de abundantes, possuem uma vasta diversidade contando com mais de 800.000 espécies descritas, distribuídas em mais de trinta ordens (GULLAN e CRANSTON, 2012). Eles vivem espalhados por todo o mundo, desde as regiões que favorecem sua dispersão, como regiões tropicais e subtropicais, até em regiões polares (GULLAN e CRANSTON, 2012; BUZZI 2017; SANTO et al., 2022).

Estes são capazes de causar variados danos em todos os órgãos vegetais, desde o período da germinação até a colheita, e também durante o armazenamento destes. Contudo, nem todos os insetos causadores de danos às plantas são classificados como inseto-praga. Para que um inseto seja considerado uma praga é necessário que os danos causados por este alcancem um determinado índice de dano econômico para a cultura em questão. Dependendo da espécie, do tamanho populacional da praga, da fase de desenvolvimento, estrutura vegetal atacada e da duração do ataque, pode haver maior ou menor prejuízo, em quantidade e em qualidade (GALLO et al., 2002).

Para se ter o controle adequado de todas as pragas que causam danos às culturas é necessário conhecer melhor quais são os insetos-praga, ou seja, quais devem ser os “alvos” dos métodos de controle de pragas. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um dos órgãos ligados à identificação e descrição de novas pragas e de pragas recorrentes. Em 2018, o MAPA atualizou a lista de pragas de importância econômica de maior risco fitossanitário com 27 principais pragas, das quais 14 são insetos (Quadro 1), nove são plantas e quatro são fungos. Em 2022, o MAPA divulgou uma lista mais detalhada, contendo hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário. Esta lista conta com 35 insetos (Quadro 1), 23 fungos, 14 plantas, seis ácaros, quatro doenças bacterianas e um nematoide.

Quadro 1: Principais pragas de importância econômica de maior risco fitossanitário para as culturas agrícolas no Brasil segundo o MAPA

Praga	Ordem e família	Nome comum	Principais culturas atacadas	Nível de risco
<i>Helicoverpa armigera</i> (Hünber)	Lepidoptera: Noctuidae	lagarta do velho mundo	Soja, Algodão e Milho	<i>Muito alto</i>
<i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith)	Lepidoptera: Noctuidae	Lagarta-do-cartucho	Soja, Algodão e Milho	<i>Muito alto</i>
<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius	Hemiptera: Aleyrodidae	mosca-branca	Feijão, Tomate, Melão e Soja	<i>Muito alto</i>
<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann, 1824)	Diptera: Tephritidae	mosca-do-mediterrâneo	Frutíferas	<i>Muito alto</i>
<i>Bactrocera carambolae</i> Drew & Hancock	Diptera: Tephritidae	Broca-da-manga	Frutíferas	<i>Muito alto</i>
<i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann)	Diptera: Tephritidae	mosca-sul-americana	Frutíferas	Alto
<i>Tuta absoluta</i> (Meyrick)**	Lepidoptera: Gelechiidae	Traça-do-tomateiro	Pimenta, Tomate e Trigo	Alto
<i>Costalimaita ferruginea vulgata</i> (Lefèvre 1885) **	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Besourinho amarelo	Algodão, Goiaba e Eucalipto	Alto

continua

<i>Oncideres impluviata</i> (Germar, 1824) **	(Coleoptera: Cerambycidae)	Besouro serrador	Eucalipto	Alto
<i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart) **	(Diptera: Tephritidae)	Mosca das frutas	Frutíferas	Alto
<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) **	(Hemiptera: Aphididae)	pulgão-verde-do- pessegueiro	Frutíferas	Alto
<i>Anastrepha grandis</i> Schiner, 1868	(Diptera: Tephritidae)	Mosca das frutas	Frutíferas	Alto
<i>Frankliniella schultzei</i> (Trybom, 1910) **	(Thysanoptera: Thripidae)	Tripes	Alface, Algodão, Berinjela, Cacau	Alto
<i>Liriomyza huidobrensis</i> (Blanchard)**	(Diptera: Agromyzidae)	Larva minadora	Legumes e vegetais	Alto
<i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lizer y Trelles) **	(Hemiptera: Psyllidae)	ampola-da-erva-mate	Erva-mate	Alto
<i>Sternochetus mangiferae</i> (Fabricius) **	(Coleoptera: Curculionidae)	Broca-da-manga	Manga e demais frutíferas	Alto
<i>Gonipterus scutellatus</i> Gyllenhal **	(Coleoptera: Curculionidae)	Gorgulho do eucalipto	Eucalipto	Alto
<i>Diabrotica speciosa</i> (Germar) **	(Coleoptera: Chrysomelidae)	Vaquinha	Feijão, soja, milho, girassol e hortaliças	Alto

continuação

<i>Rhopalosiphum padi</i> (F.) **	(Hemiptera: Aphididae)	Pulgão das folhas	Trigo	Alto
<i>Atta laevigata</i> (Smith 1858) e <i>Acromyrmex balzani</i> (Emery 1890) **	(Hymenoptera, Formicidae)	Formigas Cortadeiras	Eucalipto, laranja e cana-de-açúcar	Alto
<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1908	Hemiptera: Liviidae	Psilídeo	Citros	Alto
<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) **	(Coleoptera: Scolytidae)	Broca do café	Café	Alto
<i>Euschistus heros</i> (Fabricius)	Heteroptera: Pentatomidae	Percevejo da soja	Soja e Milho	Alto
<i>Leptopharsa heveae</i> Drake & Poor **	(Heteroptera: Tingidae)	Percevejo-de-renda	Seringueira	Alto
<i>Empoasca kraemeri</i> Ross & Moore **	(Hemiptera: Cicadellidae)	Cigarrinha verde	Algodão, Batata e oleaginosas	Médio
<i>Cosmopolites sordidus</i> (Germar) **	(Coleoptera: Curculionidae)	Moleque da bananeira	Banana	Médio
<i>Leucoptera coffeella</i> (Guér.-Mènev.) **	(Lepidoptera: Lyonetiidae)	Bicho-mineiro	Café	Médio
<i>Hedypathes betulinus</i> (Klug, 1825) **	(Coleoptera: Cerambycidae)	Broca-da-erva-mate	Erva-mate	Médio

continuação

<i>Dalbulus maidis</i> (DeLong & Wolcott) **	(Hemiptera: Cicadellidae)	Cigarrinha do milho	Milho	Médio
<i>Anthonomus tomentosus</i> (Faust) **	(Coleoptera: Curculionidae)	Bicudo-da-acerola	Frutíferas	Médio
<i>Dichelops melacanthus</i> (Dallas)	Heteroptera: Pentatomidae	Percevejo barriga verde	Soja e Milho	Médio
<i>Erinnyis ello</i> (Linnaeus, 1758) **	(Lepidoptera: Sphingidae)	Mandarová	Hortaliças e frutíferas	Médio
<i>Glycaspis brimblecombei</i> Moore **	Moore (Hemiptera, Psyllidae)	Psilídeo de concha	Eucalipto	Médio
<i>Anthonomus grandis</i> Boh	Coleoptera: Curculionidae	Bicudo-do-algodoeiro	algodão	Médio
<i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, 1978 **	(Coleoptera: Curculionidae)	Bicudo da cana de açúcar	Cana-de-açúcar	Médio
<i>Chrysodexis includens</i> (Walker)*	Lepidoptera: Noctuidae	Lagarta-falsa-medideira	Soja, Algodão e Milho	
<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)*	Lepidoptera: Noctuidae	Lagarta-da-maçã	Soja, Algodão e Milho	
<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hünber*	Lepidoptera: Erebidae	Lagarta-da-soja	Soja, Algodão e Milho	

conclusão

Fonte: Adaptado de MAPA, 2018-2022

** Pragas contidas somente na lista “hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário”

* Pragas contidas somente na lista “pragas de importância econômica de maior risco fitossanitário”

Com o aumento das perdas nas culturas, causadas pelos insetos-praga, cada vez mais se busca pesquisar as formas de controle empregadas, visando a diminuição das perdas causadas por esses insetos. Existem as mais diversas formas de controle, das quais, destacam-se alguns dos métodos mais conhecidos como culturais, resistência de plantas, controle por comportamento, controle físico, controle biológico, controle químico e controle alternativo (GALLO et al., 2002; PARRA et al., 2014). Dentre as novas medidas de controle, um método que vem ganhando cada dia mais destaque, que é o controle com o uso de inseticidas botânicos.

2.3 Os inseticidas botânicos

Algumas plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram formas próprias de defesa contra os insetos que se alimentavam delas. Esta forma de defesa consiste na sintetização de químicos, hoje denominados como metabólitos secundários, os quais não são fundamentais para a estruturação e crescimento vegetal, entretanto, são os responsáveis pela defesa dessas contra possíveis pragas e doenças. Esses metabólitos possuem propriedades inseticidas, uma vez que podem causar repelência e/ou morte desses insetos. Assim, os inseticidas botânicos consistem nos produtos extraídos dessas plantas, sejam eles produtos extraídos com água ou solventes orgânicos como álcool, acetona, clorofórmico, éter, etc., ou o próprio material vegetal moído até ser reduzido a pó (WIESBROOK, 2004).

Há registros da utilização de formas de inseticidas naturais desde 2000 a.C. na China. Como exemplo, compostos orgânicos naturais, como a piretrina, obtida das flores do crisântemo *Chrysanthemum* spp (Asterales: Asteraceae), eram utilizados como inseticidas. Também existem registros da utilização de pó de piretro sobre grãos, afim de proteger tendas de armazenamento de povos do deserto. Mais recentemente, no século XVI, atrelado à expansão agrícola, existem registros do uso de diversas plantas no controle de pragas por toda a Europa (THACKER, 2002). No Brasil, nas primeiras décadas do século XX, principalmente, entre os anos 1930 e 1940, os inseticidas botânicos foram muito populares e importantes, fomentando grande parte da agricultura da época. Isso acabou tornando o país um grande produtor e exportador destes produtos, destacando-se à época substâncias como piretro, rotenona e nicotina, que apresentam maior segurança no uso agrícola e menor impacto ambiental (MENEZES, 2005).

Muitas são as vantagens na utilização de inseticidas botânicos no controle de pragas, uma vez que estes possuem uma relação intrínseca com os insetos, e, portanto, em sua grande maioria, causem danos acentuados apenas a estes. Algumas dessas vantagens são: perturbação no desenvolvimento, crescimento e reprodução dos insetos; inibição da alimentação dos insetos; diapausa; ação de repelência e inseticida; alteração do sistema nervoso central e ação na síntese de quitina dos insetos (CHEGINI et al., 2018).

Nos últimos anos muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de avaliar o potencial dos inseticidas botânicos sobre insetos de diversas ordens. Dentre as pesquisas, verificoam-se inseticidas botânicos com potencial para o controle de insetos das ordens Lepidoptera (MOAWAD e EBADAH, 2021; ADOUANE et al., 2022), Coleoptera (MARTYNOV et al., 2019; LIYUN et al., 2020; AHMAD et al., 2023), Hemiptera (ISMAIL, COMPTON, BROOKS, 2017; GONÇALVES e DINIZ et al., 2020) Diptera (CHAABAN et al., 2018; BLIBECH, KSANTINI, SHETE, 2020; CASTRO e OLIVEIRA et al., 2022) e Hymenoptera (PINHEIRO et al., 2019; KIDANU, AZEREFEGNE, MENDESIL, 2021; SOMBRA et al., 2022).

Até pouco tempo atrás, os insetos foram rotulados apenas como insetos-praga, os responsáveis por devastarem as culturas e causarem sérios danos econômicos. Porém, esta perspectiva é bastante equivocada, pois, são inúmeros os benefícios trazidos pelos insetos para os agroecossistemas (PARRA, 2002). Seguindo esta perspectiva, muitos estudos que avaliam o efeito tóxico dos inseticidas botânicos sobre organismos não-alvos, apresentaram um aumento significativo nos últimos anos, tendo como principal objetivo adequar-se aos princípios básicos de biossegurança.

2.4 Fração hexânica de frutos e sementes de *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae)

A fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* L., popularmente conhecido como mamona, é um inseticida botânico que vem ganhando destaque. Este possui como principais metabólitos secundários terpenos, esteróis, flavonoides, taninos e fenólicos totais. Estes compostos já são conhecidos por interferirem no desenvolvimento dos insetos e até causarem a mortalidade desses (PÉRES et al., 2006; ASPÉ e FERNÁNDEZ, 2011; SUN, LIU, WANG, 2011; ZHANG, HE, HU, 2011).

A mamona *R. communis* é uma planta perene, originária do continente africano, com preferência aos climas secos e ensolarados, mas com boa adaptação a diversas condições climáticas. Possui um bom potencial de crescimento e frutificação contínua (FRANCISCO et al., 2016). No Brasil é considerada uma planta exótica, porém é abundante em grande parte do país. As regiões com maior produção da mesma são o Sul, o Sudeste e o Nordeste, sendo o estado da Bahia o maior produtor desta planta no Brasil (CONAB, 2022).

Esta planta vem se mostrando eficiente no controle de insetos-praga. É notório o recente aumento das pesquisas relacionadas à utilização dos mais diversos extratos vegetais que têm como base *R. communis*. Essas pesquisas apresentam resultados promissores quanto à eficácia desses compostos contra insetos-praga (GAHUKAR, 2017). Neste sentido o extrato de folhas e ramos de *R. communis* apresenta efeito sobre *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) na fase de ninfa, quando aplicado em folíolos de tomateiro (BALDIN et al., 2007). *Ricinus communis* em pó se mostrou eficiente contra *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae) (caruncho-do-feijão), em grãos de *Vigna unguiculata* (L.) (ALMEIDA et al., 2005). Em *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) o extrato aquoso de frutos verdes de *R. communis* a 10% provocou maior tempo de retenção em sua fase larval, bem como a inibição no seu crescimento (SANTIAGO et al., 2008), reduzindo também o percentual de pupamento de lagarta *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae) (PESSOA et al., 2014). Este mesmo inseticida, na forma de extrato aquoso de folhas e frutos, causou toxicidade para larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), causando 100% de mortalidade em todas as concentrações testadas (NEVES et al., 2014). Esse inseticida botânico na forma de óleo essencial também têm efeito sobre larvas de 4º instar de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), provocando alteração nos processos metabólicos internos (ALI, IBRAHIM, 2018). *Ricinus communis* quando ingerida por *S. frugiperda* reduziu o comportamento de canibalismo e afeta a estrutura da comunidade microbiana do intestino médio dessa lagarta (GROBLER, 2019).

A fração hexânica de *R. communis* aplicadas no controle de *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) (lagarta-falsa-medideira) apresentou o melhor desempenho dentre as demais frações extraídas desta planta, verificando-se que a concentração de 2% causou mortalidade significativa em *C. includens*

(WARMLING et al., 2019). Apesar do efeito desejado sobre organismos alvos, é necessário avaliar a segurança desse composto em organismos não-alvo.

Trabalhos têm sido realizados para avaliar a segurança dos inseticidas botânicos à base de *R. communis* para organismos não-alvo. Destes, o extrato aquoso de folhas de mamona, causaram mortalidade em ovos e ninfas de 5º ínstar de *Podisus nigripinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae), um importante predador (SANTOS et al., 2008). Abelhas alimentadas com pólen de *R. communis* em uma mistura de açúcar, mel e pólen, apresentaram diminuição nos índices de longevidade de operárias se mostrando tóxico a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (JUNIOR, 2011). O extrato hexânico de mamona também foi responsável pela alteração na preferência de parasitismo e percentual de parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead, 1893 (Hymenoptera: Scelionidae), além de causar mortalidade significativa sobre adultos deste mesmo parasitoide (OLIVEIRA, 2020). Este mesmo extrato reduziu o parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *C. includens* e apresentou toxicidade sobre a fase imatura do parasitoide (ALLEIN, 2021).

Ainda assim, poucos são os estudos que avaliaram os efeitos dos inseticidas botânicos sobre organismos não-alvo, sejam eles espécies exóticas ou silvestres, que se assemelhem ou não aos humanos (MORALES, 2008). Em eleuteroembriões de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Teleostei, Pimelodidae) nas diluições de 0,12 a 1% de extrato hexânico de *R. comunnis*, ocorreu elevada vulnerabilidade que implicou em riscos à sua viabilidade populacional. Entretanto, em menores concentrações este extrato causou poucas alterações no ciclo biológico deste animal (VIEIRA, 2020).

Acerca disso, destaca-se a importância da realização de estudos com diferentes organismos não-alvo, buscando averiguar a segurança deste inseticida botânico aos organismos presentes nos agroecossistemas, e assim, viabilizar a utilização da fração hexânica de frutos e sementes de *R. comunnis* para o controle de pragas. Destaca-se aqui dois organismos que são considerados modelos biológicos e bons bioindicadores de contaminantes, o invertebrado *A. mellifera* e o vertebrado *G. gallus domesticus*.

2.5 Aspectos biológicos de *Apis mellifera*

As abelhas são representantes do grupo de insetos extremamente relacionado à polinização. Dentre as espécies de abelhas *A. mellifera* é conhecida pela sua forma de organização social, uma vez que possui uma hierarquização nas colônias. Esta hierarquização é dividida em duas distintas castas: rainha e operárias.

A atividade de criação de abelhas para obtenção de produtos apícolas é chamada de apicultura, e considerada uma alternativa de subsistência para o agricultor familiar. A apicultura permite a melhoria da qualidade de vida dos produtores, oferecendo uma fonte alternativa de renda, bem como, ser uma atividade de subsistência que não causa impactos negativos ao agricultor e ao ambiente. A agricultura familiar por sua vez, contribui de forma eficiente e crescente em grande parte da produção alimentícia brasileira, neste contexto, salienta-se a importância da apicultura como uma forma de produção altamente rentável no Brasil e no mundo (POSTELARO, AQUINO, FERRAREZI JUNIOR, 2021). Esta atividade se adequa ao tripé da sustentabilidade, sendo relevante para o fator social, econômico e ambiental (SOARES, SANTOS, 2009).

A apicultura brasileira teve início logo que as abelhas europeias foram introduzidas, ainda no século XIX, quando algumas espécies de *A. mellifera* (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica* e *A. mellifera ligustica*) foram trazidas da Europa (SILVA, 2004). Posteriormente, houve um avanço considerável na apicultura através das abelhas africanas *A. mellifera scutellata* trazidas da África pelo pesquisador Dr. Warwick Estevam Kerr em 1956, dando início a comercialização do mel em território nacional. Entretanto, 26 das colônias trazidas pelo Dr. Kerr enxamearam, cruzando com as até então abelhas europeias, dando origem as abelhas africanizadas (PEREIRA et al., 2003).

As abelhas africanizadas, presentes em todo o território brasileiro, são apontadas como as responsáveis pela apicultura no Brasil, destacando-se no ambiente devido a taxa de produção, a rusticidade, a eficiência de polinização e ao rápido desenvolvimento da colônia (GONÇALVES, 2022). A região com maior produção de mel no País é a região Sul, 7,8 mil toneladas de mel foram produzidas no Paraná em 2020. Cerca de 15% do mel produzido no Brasil, até este ano, foi proveniente do estado do Paraná (PARANÁ, 2022).

As abelhas são também responsáveis pela maior parte da polinização dos cultivos agrícolas, como a soja, a qual é um exemplo clássico de produto com fácil expansão de mercado, o que implica diretamente em aumento nos rendimentos acarretados pela polinização e, conseqüentemente, no barateamento da produção (CHIARI et al., 2008; GARIBALDI et al., 2021). Muitos estudos salientam a relação intrínseca entre as colônias de abelhas e a produção agrícola mundial, como retratou Calderone (2012) em uma análise da produtividade das safras nos anos de 1992 a 2009, onde observou no decorrer dos anos a diminuição da população de polinizadores, associada à diminuição da produtividade das safras. Giannini et al. (2015) realizou um estudo de análise da dependência dos polinizadores sobre diferentes safras brasileiras, onde ao analisar 141 lavouras brasileiras, constataram que os polinizadores eram essenciais para 18 destas, outras 25 lavouras se mostraram dependentes destes. Ao analisar o valor total da produção anual das culturas dependentes, ainda segundo estes, é possível observar que dos ~US\$ 45 bilhões, a contribuição dos polinizadores foi de ~US\$ 12 bilhões.

Há décadas observa-se que a riqueza de espécies não domesticadas de abelhas e de outros polinizadores vem diminuindo, dando origem ao fenômeno conhecido como “declínio das abelhas”, porém, as evidências das causas dessas reduções não são precisas. Todavia, sabe-se que neste mesmo período, houve um aumento significativo na demanda por insetos polinizadores de culturas, evidenciando assim a importância dos polinizadores. Esta crescente valorização dos polinizadores acaba por estimular as pesquisas sobre as possíveis causas do declínio das abelhas. Algumas das causas já citadas em estudos são: perda de habitat; exposição de polinizadores a parasitas e patógenos emergentes; exposição a coquetéis de agroquímicos e mudanças climáticas (GOULSON et al., 2015; ABATI, et al., 2021).

Dentre estes fatores, um dos que causa maior preocupação é a mortalidade das abelhas, o que pode afetar diretamente a produção de alimentos no mundo, uma vez que, direta ou indiretamente as abelhas apresentam uma importante contribuição no processo de polinização da maior parte dos alimentos consumidos (OLIVEIRA, 2015). Para evitar que essa situação se agrave, faz-se necessário encontrar equilíbrio entre as cadeias de produção, além de suma importância o desenvolvimento de programas de segurança monitoramento e conservação desses importantes polinizadores.

Os exemplares de *A. mellifera* são considerados insetos grandes quando comparados às demais espécies da família Apidae, o que favorece o uso desta espécie nas criações em apiários, bem como, favorece o uso destas como modelo biológico. Também são excelentes bioindicadores devido à sua capacidade de fornecer informações sobre a presença de agrotóxicos no ambiente, uma vez que as abelhas estão em contato direto com o ambiente devido ao seu hábito de forrageamento (CELLI e MACCAGNANI, 2003; COUTO e COUTO 2006; QUIGLEY, AMDAM, HARWOOD, 2019).

2.6 Aspectos biológicos do embrião de *Gallus gallus domesticus*

O desenvolvimento inicial de todos os vertebrados é muito semelhante, sendo que apenas, posteriormente, os processos tornam-se espécie-específicos, definindo padrões característicos de cada espécie (GILBERT, 2001). Portanto, pode-se comparar este desenvolvimento entre aves, mamíferos e outros vertebrados (BORGES, 2017). Assim, o estudo com embriões em seu desenvolvimento inicial é um meio vantajoso para pesquisas sobre os efeitos das mais diversas substâncias nessa fase do desenvolvimento embrionário. *Gallus gallus domesticus*, uma ave conhecida comumente como galinha, é considerado um modelo versátil na embriotoxicologia, por não possuir interferências maternas e humorais, o que torna possível a avaliação das alterações apresentadas sobre os mais diversos compostos (PINTO, 2021).

Para vertebrados, um dos modelos biológicos mais utilizados é o embrião de ave que é padrão em pesquisas que demandam dados sobre a toxicidade e/ou seletividade da substância a um vertebrado. Este uso justifica-se, pois, o desenvolvimento embrionário desta ave é muito semelhante, em suas fases iniciais, ao desenvolvimento, de anfíbios, répteis e mamíferos (GILBERT, 2001; GILBERT, BARRESI, 2019). Os embriões de ave hoje são os modelos biológicos mais utilizados em estudos relacionados com a toxicidade de substâncias a embriões de vertebrados em sua fase inicial do desenvolvimento. Isto ocorre tanto pela semelhança do desenvolvimento deste com os demais vertebrados nesta fase, quanto pelas inúmeras vantagens que favorecem a sua utilização, dentre essas: facilidade de obtenção, custo reduzido, descrição completa de cada etapa do desenvolvimento em bases literárias, desenvolvimento externo e, conseqüentemente, o não abatimento da fêmea reprodutora, fácil manuseio laboratorial, eutanásia do embrião prática e de baixo custo

(BARBOSA, 1995). Outros pontos positivos da utilização dos embriões de *G. gallus domesticus* como modelo biológico vertebrado são os ovos megalócitos, possuindo reservas nutricionais e não dependendo do organismo materno para se desenvolver; apresentam membranas envoltórias resistentes; tempo de desenvolvimento relativamente curto (21 dias); pode ser acompanhado facilmente em laboratório pois de desenvolvem na região superior do ovo (SCHOENWOLF, 1999).

Para que durante a embriogênese ocorra o desenvolvimento do embrião algumas condições são necessárias, como temperatura adequada (37°C), umidade e oxigenação, durante todos os 21 dias até a eclosão (GONZALES, 1994). A embriogênese só irá acontecer após a postura dos ovos, e apenas quando os ovos estiverem em condições favoráveis para expressão gênica e fenotípica (WOLPERT, 2000). A partir deste momento ocorrem as alterações celulares e morfológicas deste embrião. Essas alterações são relacionadas com o desenvolvimento e estão definidas e organizadas em estágios de desenvolvimento (HAMBURGER e HAMILTON, 1951).

A presença de substâncias exógenas durante o desenvolvimento embrionário, possivelmente, altera os mecanismos da embriogênese, chegando em alguns casos a ser até letal. Essas anormalidades podem ser usadas como indicadores do potencial tóxico da substância exógena em questão (WALTERS et al., 1987).

Os estágios pré-natais dos seres humanos são considerados períodos sensíveis, citados muitas vezes como o período mais sensível ao efeito dos poluentes ambientais, já que nesse estágio ocorre uma alta taxa de proliferação e, principalmente, de diferenciação celular (KMECICK, 2017). Neste sentido, para estudo o desenvolvimento embrionário de aves entre os dias 3 a 5, é muito semelhante, morfológicamente, ao desenvolvimento embrionário humano, no período de 3 a 5 semanas, período destacado pela formação das vértebras a partir da notocorda, da formação de uma porção caudal e da formação de sulcos faríngeos (MONTANARI, 2013). Essas características tornam o embrião de ave um modelo biológico excelente para avaliar os efeitos de agentes estranhos sobre o desenvolvimento embrionário e, dependendo dos estágios avaliados, pode-se fazer importantes relações comparando as alterações observadas entre os diferentes grupos de vertebrados, principalmente, em seu desenvolvimento inicial, e a prospecção para o que pode ocorrer em embriões humanos na mesma fase do desenvolvimento (GILBERT e BARRESI, 2019).

3. CAPÍTULO I – TOXICIDADE DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Ricinus communis* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE) A OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

3.1 Introdução

Os danos causados pelos inseticidas ao ambiente, às espécies não-alvo, tanto invertebrados quanto vertebrados, geram discussões sociais e, conseqüentemente, pressão aos órgãos públicos vinculados a agricultura, para que estes desenvolvam formas de controlar o uso dos agrotóxicos e substituí-los por produtos mais seguros e seletivos (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003). Um dos métodos de controle que vem ganhando destaque é o uso dos inseticidas botânicos, os quais tem como finalidade o controle de insetos-praga, com menor impacto ambiental, visando manter o equilíbrio biológico com base na sustentabilidade dos agroecossistemas. Este controle baseia-se na interação natural entre as plantas utilizadas para extração do produto vegetal e os insetos que causam danos a estas (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003; MARANGONI et al., 2012; CHEGINI et al., 2018; SPLETOZER, et al., 2021).

Na prospecção de novos inseticidas botânicos, uma planta que vem ganhando destaque, é a mamona *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae). Esta planta possui metabólitos secundários que incluem compostos terpenos (PÉRES et al., 2006), esteróis (SUN, LIU, WANG, 2011), flavonoides (SUN, LIU, WANG, 2011; ZHANG, HE, HU, 2011), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011; YEBOAH, et al., 2020). Estes metabólitos são responsáveis por causar danos ao desenvolvimento, ciclo biológico, ou até levar os insetos à morte, o que torna os extratos de *R. communis* excelentes medidas para o controle de insetos-praga (SANTIAGO et al., 2008; VIZZOTO, KROLOW, WEBER, 2010; ALI, ALI e IBRAHIM, 2018; RIOBA e STEVENSON, 2020).

Produtos produzidos a partir de *R. communis* apresentam efeito inseticida e de repelência comprovados contra vários insetos. Neste caso, o óleo essencial de *R. communis* causou repelência de 50 a 80% em adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) (SALEM et al., 2017). Já o extrato hexânico desta planta causou mortalidade acima de 60% de *Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae) (SOTELO-LEYVA, 2020).

Apesar do efeito inseticida, que é positivo para o controle de insetos-praga, é importante analisar a seletividade dos produtos, à base de *R. communis*, para organismos não-alvos. Assim, a biossegurança é um fator determinante na escolha pela implantação ou não de novos inseticidas botânicos (MARANGONI et al., 2012). Há algumas décadas as abelhas têm sido empregadas para monitorar a poluição ambiental, pois estas são ativas em todo entorno da colmeia, podendo manter até uma área de sete quilômetros quadrados “sob seu controle” (CELLI e MACCAGNANI, 2003; PAPA, 2022).

As abelhas quando saem da colmeia estão diretamente expostas aos inseticidas botânicos, pois estão constantemente forrageando cultivos. Dentre as abelhas, a espécie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) é a mais observada e estudada. Além disso, a abelha é considerada um inseto útil pelo fato de realizar a coleta de pólen, néctar e água das plantas, principalmente das flores, auxiliando na polinização e promovendo rápida fecundação (CELLI, MACCAGNANI, 2003; COUTO, COUTO 2006; QUIGLEY, AMDAM, HARWOOD, 2019). Tendo em vista toda a problemática relacionada aos altos índices de mortalidade de *A. mellifera* observados quando estas são expostas aos inseticidas químicos sintéticos, é fundamental buscar formas de minimizar ou otimizar o uso de inseticidas químicos sintéticos nas culturas (GOULSON et al., 2007; ABATI et al., 2021; SIVITER et al., 2021). Frente a isto, a busca por inseticidas menos agressivos ao ambiente e aos organismos não-alvo tem sido recorrente, com destaque aos inseticidas botânicos.

Para tanto, é necessário também testar os efeitos toxicológicos dos inseticidas botânicos sobre as abelhas, uma vez que, é sabido que muitos apresentam efeitos letais e subletais às mesmas (OLIVEIRA, et al., 2015; PINHEIRO, et al., 2019; TELLES, et al., 2020; TOLOU, et al., 2022). *Ricinus communis* apresenta efeito inseticida em suas mais variadas formas; o pólen desta planta causa danos à longevidade de *A. mellifera* (ASSIS, 2011). Desta forma é fundamental que pesquisas mais aprofundadas sobre o efeito de *R. communis* para *A. mellifera* sejam realizadas, a fim de averiguar os níveis de toxicidade deste inseticida botânico a este organismo não-alvo. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos toxicológicos da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* sobre operárias de *A. mellifera* africanizada.

3.2 Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle Biológico (LABCON) e no apiário experimental na Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura UNEPE – Apicultura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos – UTFPR-DV).

3.2.1 Obtenção da Fração Hexânica de Folhas e Sementes de *Ricinus Communis* e obtenção de *Apis mellifera*

A FHFSRc foi preparada a partir dos frutos inteiros. Esses foram coletados em área de vegetação nativa. O material vegetal coletado permaneceu em secagem na sombra por, aproximadamente, 24 h à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Na sequência, foi colocado em envelope de papel Kraft (60 X 80 cm), permanecendo em estufa de secagem de circulação forçada por 48 h a 60°C , conforme Allein (2021).

Após a secagem e avaliação do peso, dos frutos e das sementes de *R. communis*, realizou-se a trituração em moinho de facas tipo Willey (ALPAX), até que toda a massa vegetal estivesse como um pó com granulometria de, aproximadamente, 0,5 mm. Em seguida, diluíram-se 20 g deste pó em 200 mL de álcool 80%, em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Essa mistura foi colocada em banho de água termostaticado a 60°C , por 30 minutos. Posteriormente, o produto obtido foi filtrado em um balão Kitasato, com membrana filtrante de 8μ , marca UNIFIL, com o auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE058), em pressão constante de $1,2 \text{ kgf/cm}^2$.

Após a filtragem, o produto foi submetido ao processo de rotaevaporação, em evaporador rotativo (MARCONI – MA 120), sob temperatura entre 55 a 60°C , acoplado a uma bomba de vácuo sob pressão constante de $0,35 \text{ kgf/cm}^2$ para a retirada do álcool 80%. Após isso, os compostos restantes foram resuspendidos em água destilada atingindo o volume de 200 mL, denominado extrato bruto.

O extrato bruto foi fracionado por meio da técnica de extração líquido-líquido (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Com o auxílio de um funil de separação com capacidade volumétrica de 1.000 mL colocou-se o volume de 250 mL do extrato bruto de *R. communis* e 250 mL do extrator hexano. A mistura foi agitada manualmente por cerca de um minuto para obter maior homogeneização e após 15 minutos de repouso, ocorreu a separação de duas frações desse extrato. O extrato bruto ficou depositado na parte inferior do funil e a fração hexânica na parte superior, sendo coletada a parte de interesse através da torneira do funil de separação. A fração hexânica foi novamente encaminhada para o evaporador rotativo (MARCONI – MA 120) em

temperatura de 42 a 45°C, para a remoção completa dos solventes, obtendo-se assim a FHFSRc utilizada neste trabalho. A FHFSRc ainda foi diluída em Tween 80® a 0,01% para se obter as concentrações padrão para o experimento, sendo de 1%, 1,5% e 2% (VIEIRA, 2020).

As operárias de *A. mellifera* foram obtidas a partir dos favos de cria operculada produzidos na UNEPE- Apicultura (Figura 2). Para a coleta destas abelhas, as colmeias contendo os quadros foram observadas diariamente até a identificação da presença de ovos de um dia (Figura 3) e a partir deste momento foi feita a contagem até o 19º dia, quando foram retirados do Apiário (Figura 4).

Após a retirada, esses foram acondicionados em envelopes de papel Kraft, lacrados e perfurados para entrada de ar e transportados até o LABCON, onde foram armazenados em uma câmara climatizada que simula o ambiente da colmeia até o período da emergência (30 ± 2 °C e UR de $60 \pm 10\%$). Este método de coleta uniformiza a idade das operárias utilizadas nos bioensaios, as quais foram padronizadas com idade de 24 a 48h de vida adulta. Todos os bioensaios realizados com *A. mellifera* foram compostos por seis repetições para cada tratamento, sendo cada repetição composta por 10 abelhas operárias forrageiras (Tabela 1).

Figura 2: Favos de cria operculada de *Apis mellifera* produzidos no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 3: Identificação da presença de ovos de um dia de *Apis mellifera* realizada no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 4 : Retirada dos quadros de *Apis mellifera* realizada no UNEPE Apicultura da UTFPR-DV



Fonte: Autoria Própria (2022)

Tabela 2: Tratamentos utilizados para avaliar a toxicidade de *Ricinus communis* a *Apis mellifera*

Tratamentos	Composição
Tratamento 1 (T1)	1% da FHFSRc + 99% de solução de Tween 80® a 0,01%
Tratamento 2 (T2)	1,5% da FHFSRc + 98,5% de solução de Tween 80® a 0,01%
Tratamento 3 (T3)	2% da FHFSRc + 98% de solução de Tween 80® a 0,01%
Tratamento 4 (T4)	Água destilada
Tratamento 5 (T5)	Solução de Tween 80® a 0,01%

Fonte: Autoria Própria (2022)

FHFSRc: Fração Hexânica de Frutos e Sementes de *Ricinus communis*

3.2.2 Bioensaio 1 – Contato de operárias com superfície contaminada com FHFSRc
 Placas de Petri (15 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) foram pulverizadas com 290 µL dos tratamentos apresentados na Tabela 1, utilizando para isto um aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Tecnal® (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm²) (Figura 5). Na sequência estas placas foram levadas a uma capela de fluxo laminar onde permaneceram até estarem totalmente secas (aproximadamente 30 minutos) e prontas para receberem as abelhas. Em seguida, as operárias de *A.*

mellifera foram anestesiadas, por até 120 segundos, com CO₂ e foram acondicionadas em grupos de 10 abelhas por placa (Figura 6).

As placas de Petri foram então transferidas para uma sala de criação no LABCON, onde permaneceram nas placas de Petri por duas horas em contato com a superfície contaminada com FHFSRc (Figura 7). Após duas horas em contato, as operárias foram novamente anestesiadas com CO₂ e transferidas para gaiolas de PVC (policloreto de vinila) (20 cm de altura × 10 cm de diâmetro), sendo 10 abelhas por gaiola. Foram inseridos em cada gaiola um recipiente plástico (2,7 cm × 1,2 cm) descartável com uma tela antiafídica colada sobre a mesma, neste recipiente plástico foi inserida uma mistura de água e açúcar na proporção 1:1 com o auxílio de pipeta de Pasteur. Em seguida as gaiolas foram cobertas com tecido *Voile*, e alocadas nesta mesma sala de criação, onde permaneceram por 48h, até as avaliações de mortalidade terminarem.

As avaliações de mortalidade ocorreram após uma, duas, três, quatro, cinco, seis, 12, 18, 24, 36 e 48h, sendo contabilizado o número de operárias mortas à cada período. Foram consideradas mortas as operárias que não apresentaram nenhum movimento após estímulo físico, feito com o auxílio de uma pinça.

Figura 5: Pulverização dos tratamentos à base de FHFSRc em placa de Petri



Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 6: Processo de anestesia de operárias de *Apis mellifera* com CO₂



Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 7: Operárias de *Apis mellifera* em contato com superfície tratada com FHFSRc



Fonte: Aatoria Própria (2022)

3.2.3 Bioensaio 2 -Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de *A. mellifera*

Para este bioensaio, as operárias foram anestesiadas com CO₂, por no máximo 120 segundos, e transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura × 10 cm de diâmetro), sendo 10 abelhas por gaiola. Na sequência foram levadas até a sala de criação do LABCON, onde permaneceram por duas horas, sem alimento, garantindo que se alimentassem do tratamento assim que lhes fossem ofertadas.

Os tratamentos foram incorporados às dietas preparadas através de uma solução de solúvel: açúcar (1:1), onde o solúvel corresponde a água + a FHFSRc na concentração a ser testada. Foram inseridos em cada gaiola um recipiente plástico (2,7 cm Ø × 1,2 cm) descartável com uma tela antiafídica colada sobre a mesma onde continha os tratamentos e, sequencialmente, as gaiolas foram cobertas com um tecido *Voile*. As gaiolas então foram alocadas em estantes presentes nesta mesma sala de criação, onde permaneceram por 48h para serem feitas as avaliações de mortalidade. As avaliações ocorreram após uma, duas, três, quatro, cinco, seis, 12, 18, 24, 36 e 48h sendo contabilizado o número de operárias mortas a cada período. Foram consideradas mortas as operárias que não apresentaram nenhum movimento após estímulo físico, realizado com o auxílio de uma pinça.

3.2.4 Bioensaio 3 - teste de voo (deslocamento vertical)

O teste de voo foi executado de acordo com a metodologia descrita por Tomé et al. (2015) e adaptada por Libardoni et al. (2021). As abelhas testadas foram expostas ao FHFSRc com o contato em superfície contaminada. As placas de Petri

(15 cm Ø × 1,5 cm) foram pulverizadas com 290 µL dos tratamentos, utilizando para isto um aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Tecnal® (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm²) conforme os tratamentos apresentados na Tabela 1. Na sequência, as placas foram levadas para capela de fluxo laminar para evaporação do líquido (por aproximadamente 30 minutos). As operárias de *A. mellifera* foram anestesiadas, por até 120 segundos, com CO₂ e foram acondicionadas em grupos de 10 abelhas por placa.

As placas de Petri foram então transferidas para sala de criação, onde as operárias de *A. mellifera* permaneceram por duas horas em contato com a superfície contaminada com FHFSRc. Após este período as operárias, foram anestesiadas com CO₂ e transferidas para gaiolas de PVC (20 cm × 10 cm Ø), 10 abelhas por gaiola. Foram inseridos em cada gaiola um recipiente plástico (2,7 cm Ø × 1,2 cm) descartável com uma tela antiáfídica colada sobre a mesma, nesta foi inserida uma mistura de água e açúcar na proporção 1:1 com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As gaiolas foram então cobertas com tecido *Voile* e alocadas na sala de criação, onde, diferentemente dos bioensaios 1 e 2, permaneceram por 24h, até as avaliações de voo serem realizadas.

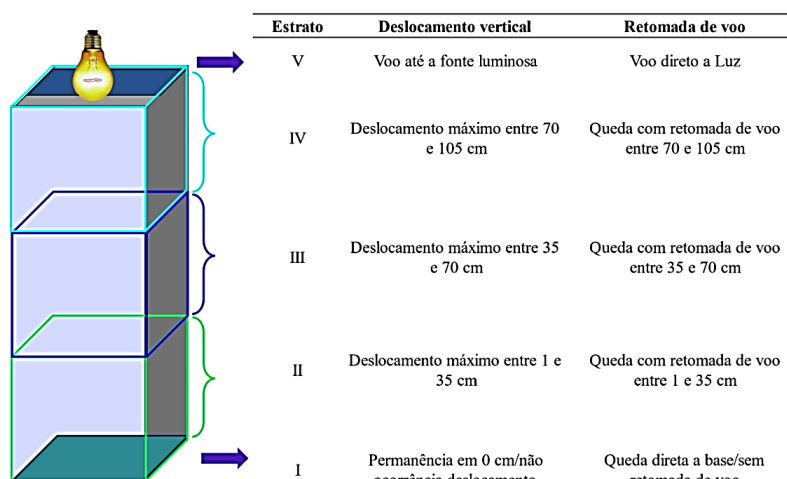
O teste de voo foi conduzido em uma sala escura, contendo uma torre de voo feita de madeira (35 cm de comprimento × 35 cm de largura × 105 cm de altura) (Figura 8), com cinco níveis de altura (Figura 9), contendo um Voil cobrindo a parte da frente da torre e uma luminária ligada em sua parte superior. As operárias, 24h após a exposição aos diferentes tratamentos, foram soltas, uma por vez, sobre a base inferior da torre de voo e observadas por um minuto, e assim foi registrado o nível máximo que estas abelhas alcançaram com o voo.

Figura 8: Torre de voo para operárias de *Apis mellifera* utilizada no bioensaio 3, com a fonte de luz.



Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 9: ilustração dos estratos da torre de voo em relação ao deslocamento vertical de operárias de *Apis mellifera*



Fonte: Autoria Própria (2022)

3.3 análise estatística

Os dados de mortalidade das operárias de *A. mellifera* foram submetidos a análise de sobrevivência comparando os tratamentos usando o teste de log-rank (Harrington, 2005). Este teste é realizado no R usando a função `survdiff()`. O teste também é denominado de teste de [Mantel–Cox].

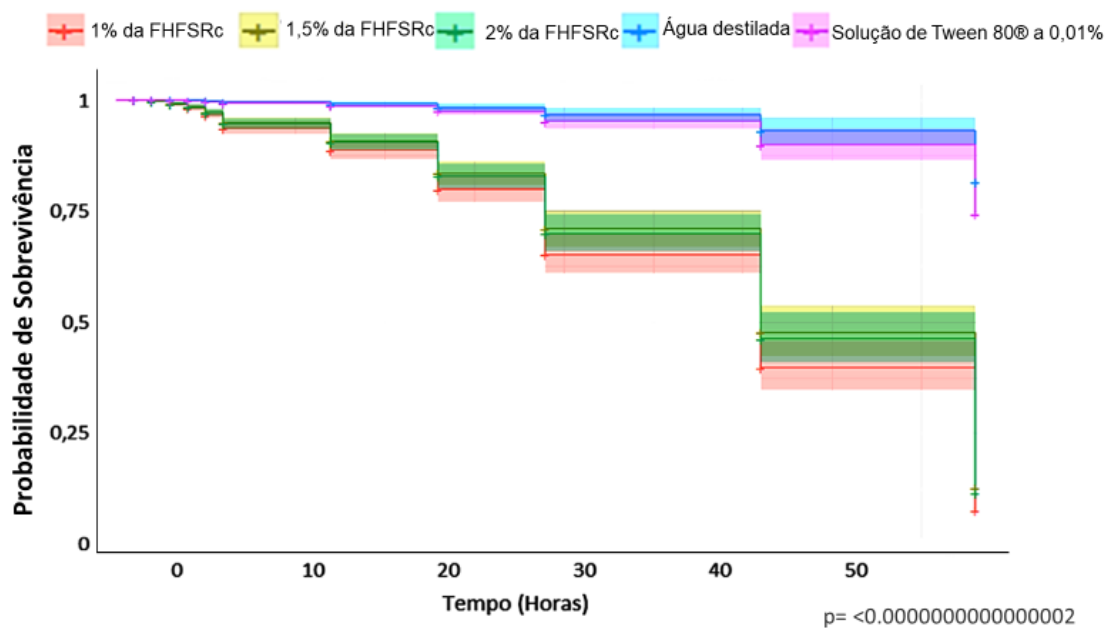
O modelo para o teste de voo e queda foi ajustado pelo método da máxima verossimilhança utilizando-se o software Rstudio, pacote `ordinal`. Em seguida foi aplicada uma análise de deviança (razão de verossimilhanças e teste de qui quadrado) (R Core Team, 2022).

3.4 Resultados

3.4.1 Bioensaio 1 – Contato de operárias de *A. mellifera* com superfície contaminada com FHFSRc

As abelhas operárias de *A. mellifera* oriundas dos tratamentos T1 (1% da FHFSRc), T2 (1,5% da FHFSRc) e T3 (2% da FHFSRc) tiveram redução acentuada na probabilidade de sobrevivência, apresentando menos de 50% de probabilidade de sobrevivência nos três tratamentos, ao final das 48 horas. Enquanto as abelhas dos tratamentos T4 (Água destilada) e T5 (Solução de Tween 80® a 0,01%) apresentaram probabilidade de sobrevivência superior a 85%, mesmo após as 48h, sendo estas as maiores médias de probabilidade de sobrevivência (Gráfico 2).

Gráfico 2: Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contato com superfície vítrea tratada com diferentes concentrações do FHFSRc de *Ricinus communis*

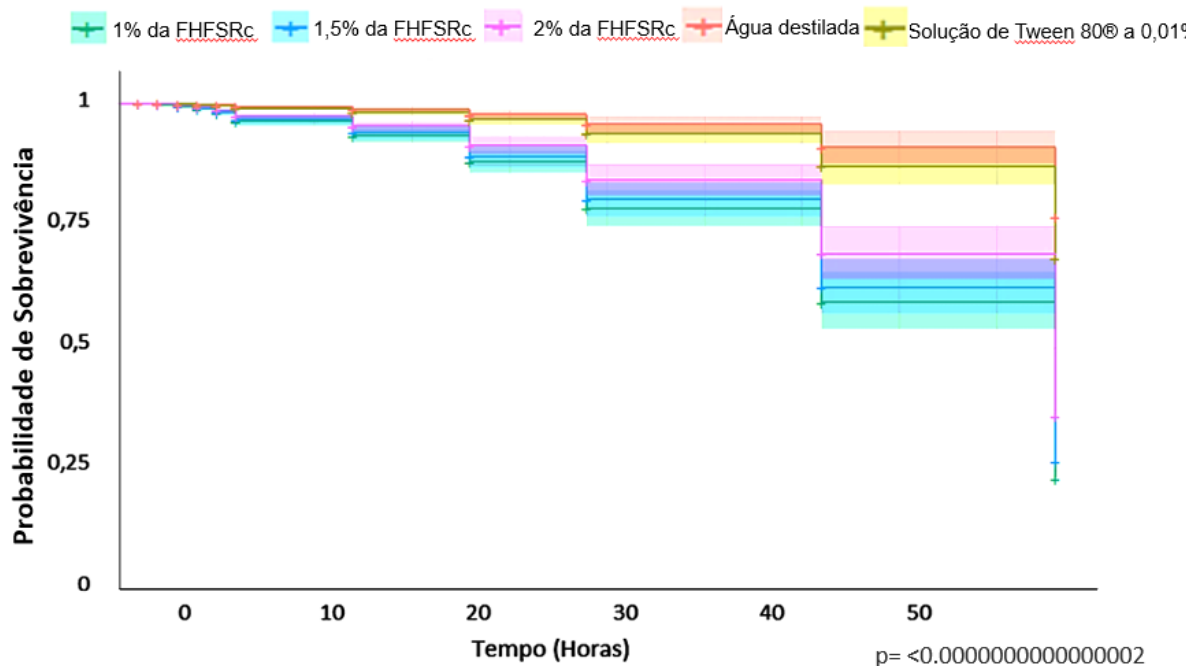


Fonte: Autoria Própria (2022)

3.4.2 Bioensaio 2 -Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de *A. mellifera*

Os tratamentos que provocaram redução na probabilidade de sobrevivência de *A. mellifera*, após as 48h, foram o T1 (1% da FHFSRc), T2 (1,5% da FHFSRc) e T3 (2% da FHFSRc), sendo a probabilidade de sobrevivência inferior a 75%. Os tratamentos T4 (Água destilada) e T5 (Solução de Tween 80® a 0,01%) não causaram efeitos negativos, sendo que as operárias apresentaram probabilidade de sobrevivência superior a 85%, após às 48 horas em ambos os tratamentos (Gráfico 3).

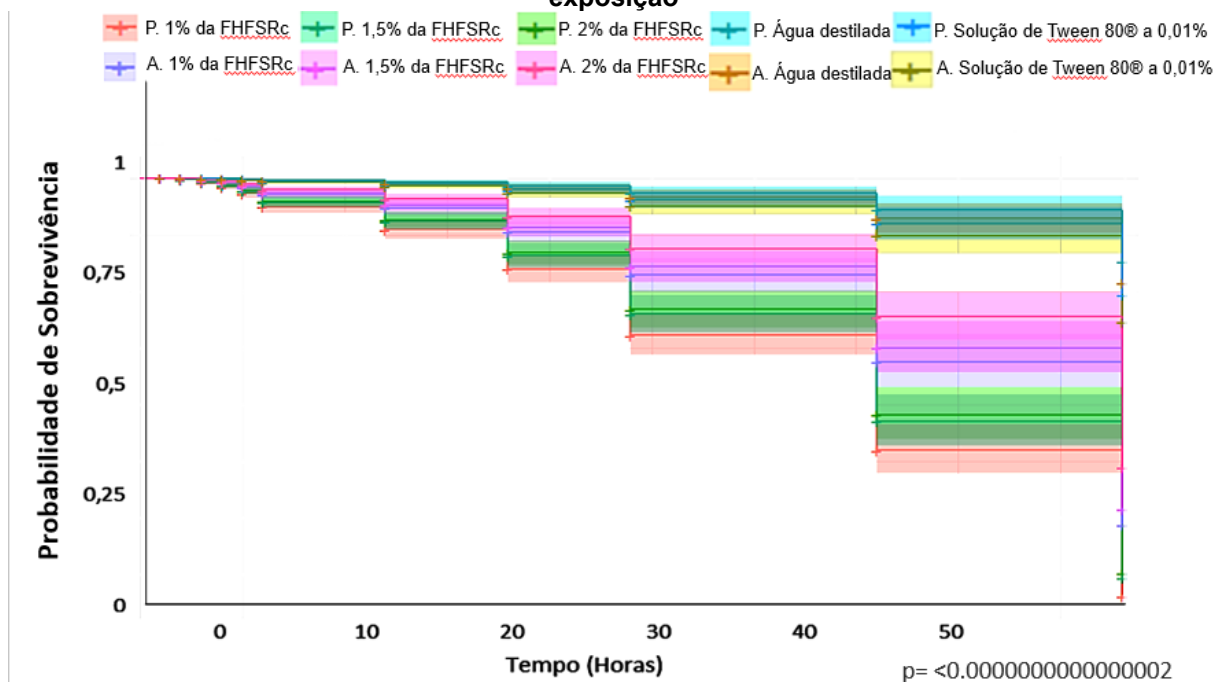
Gráfico 3: Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após serem alimentadas com diferentes concentrações do FHFSRc de *Ricinus communis*



Fonte: Autoria Própria (2022)

Quando analisados em conjunto é possível observar que ambos os ensaios seguem o mesmo padrão, onde tanto o bioensaio 1 (contato de operárias com superfície contaminada com FHFSRc) quanto o bioensaio 2 (Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de *A. mellifera*) apresentam as menores taxas de probabilidade de sobrevivência de operárias de *A. mellifera* nos tratamentos T1 (1% da FHFSRc), T2 (1,5% da FHFSRc) e T3 (2% da FHFSRc), todos à base de FHFSRc. Enquanto, as maiores taxas de probabilidade de sobrevivência, são das abelhas oriundas dos tratamentos T4 (Água destilada) e T5 (Solução de Tween 80® a 0,01%), ambos controles (Gráfico 4). Observa-se ainda que, a FHFSRc quando exposta pelo método de exposição do bioensaio 1 é mais tóxica para as abelhas quando comparado ao método de ingestão, uma vez que as operárias de *A. mellifera* expostas ao bioensaio 1 apresentaram as menores taxas de sobrevivência.

Gráfico 4: Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* após contado com diferentes concentrações do FHFSRc de *Ricinus communis* em diferentes formas de exposição



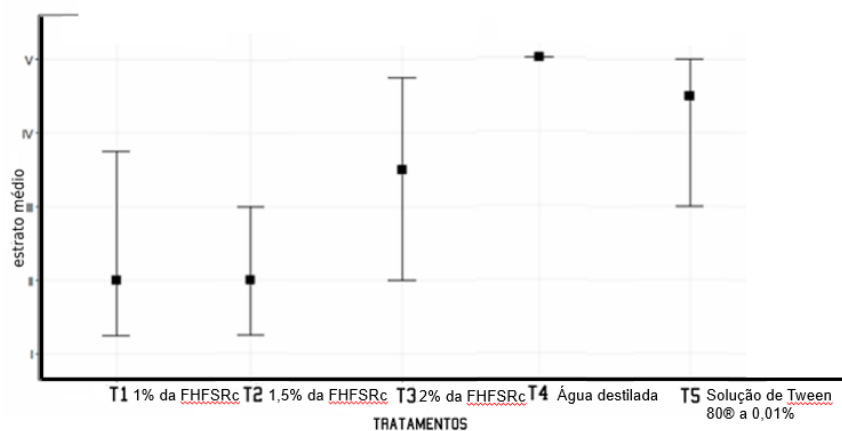
Fonte: Autoria Própria (2022)

P.: Contato de operárias de *A. mellifera* com superfície contaminada (bioensaio 1); A.: Ingestão de dieta por *A. mellifera* (Bioensario 2).

3.4.3. Bioensaio 3 - teste de voo (deslocamento vertical)

Neste bioensaio, as abelhas oriundas dos tratamentos com o FHFSRc apresentaram menores médias de deslocamento. Em nenhum dos tratamentos contendo FHFSRc as abelhas apresentaram deslocamento vertical igual ou superior aos dos tratamentos controles, destacando ainda que, em nenhuma das repetições com os tratamentos à base de FHFSRc alcançaram o estrato V (Gráfico 5).

Gráfico 5: Gráfico de plot representando o deslocamento vertical de *Apis mellifera* submetidas ao bioensaio 3.



Fonte: Autoria Própria (2022)

3.5 Discussão

Os extratos hexânicos interferem no comportamento, no desenvolvimento e na sobrevivência de organismos não-alvo. No presente trabalho, foi observado que em todos os tratamentos contendo o FHFSRc, as abelhas apresentaram probabilidade de sobrevivência inferior a 75% em 48h, sendo que, as menores probabilidades de sobrevivência são dos tratamentos do bioensaio 1, onde *A. mellifera* foi exposta ao contato com superfície contaminada com FHFSRc. Neste mesmo sentido, os extratos hexânicos de graviola (*Annona muricata* L., Magnoliales: Annonaceae) e maçã (*Malus* sp., Rosales: Rosaceae) interferiram na capacidade predatória e na fecundidade de *Eriopsis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae), quando este organismo ingeriu ninfas de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) contaminados com esses extratos (SANTOS et al., 2018). O extrato hexânico de ínula (*Inula racemosa*, Asterales: Asteraceae) também interferiu no desenvolvimento e desempenho de *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) resultando no aumento da mortalidade, redução do potencial reprodutivo e prolongamento do tempo de desenvolvimento do parasitoide (KAUR et al., 2021).

Muitos inseticidas a base de *R. communis* apresentam efeitos adversos a insetos benéficos. Neste trabalho a FHFSRc apresentou probabilidade de sobrevivência reduzida em qualquer um dos tratamentos, ficando em torno de 25% a 75%, bem como, alterou o deslocamento vertical dessas abelhas. Seguindo esta perspectiva, pode-se afirmar que *A. mellifera* quando submetida a qualquer um dos tratamentos com FHFSRc apresentou efeitos adversos. Assim como a FHFSRc, o óleo de mamona a 3%, influenciou no comportamento do parasitoide *Trichogramma*

pretiosum Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), reduzindo a taxa de parasitismo em mais de 30% (BESTETE et al., 2011). Este mesmo óleo, nas concentrações de 1% e 2%, foi seletivo ao estágio de ovo-larva de *T. pretiosum*; já em 3%, 4%, 5% e 6% foi levemente nocivo (30%-79% de mortalidade). Para os estágios de pré-pupa e pupa deste mesmo parasitoide todas as concentrações se mostraram nocivas (>99% de mortalidade), sendo 1% a única levemente nociva (30%-79% de mortalidade) (MARQUES, 2015).

Existem ainda muitos outros inseticidas botânicos frequentemente apontados como seguros ecologicamente, mas que podem causar efeito tóxico a organismos não-alvo, como parasitoides ou abelhas (CINTRA; MALASPINA; BUENO, 2005; OLIVEIRA et al., 2021; GAIOLA; CARDOSO, 2022). Um exemplo disso são o óleo de nim (*Azadirachta indica*, A. Juss Sapindales: Meliaceae) e o extraído de alho (*Allium sativum*, L., Asparagales: Amaryllidaceae) que causaram toxicidade aguda em larvas e operárias de *A. mellifera* (XAVIER et al., 2015; KAUR, SINGH, SINGH, 2022). Além disso, os inseticidas botânicos ainda causam alterações no comportamento de forrageamento de operárias adultas, pois estas visitaram com menor frequência xaropes que continham inseticidas botânicos, e com mais frequência xaropes do tratamento controle, indicando assim que os xaropes contendo inseticidas botânicos têm um efeito de repelência a *A. mellifera* (XAVIER et al., 2015). Apesar da repelência não ter sido analisada no presente trabalho, verificou-se que, tanto no bioensaio 1 quanto no bioensaio 2, as concentrações mais altas de FHFSRc apresentaram menor probabilidade de sobrevivência, destacando que a concentração intermediária foi a que provocou as menores taxas de sobrevivência dentre as três concentrações, e a concentração basal (1%) a que apresentou maior probabilidade de sobrevivência.

Assim, pode-se pressupor que, concentrações mais altas causaram efeito de repelência a operárias de *A. mellifera*, diminuindo a busca por alimentos, bem como, presume-se que, quando em contato com as maiores concentrações de FHFSRc, as abelhas realizaram menos movimentos e, conseqüentemente, se contaminaram menos.

Bombus terrestris L. (Hymenoptera: Apidae) quando expostas à dose recomendada de azadiractina (Nimbecidina) através da alimentação à base de xarope de açúcar tratado e pólen tratado, apresentou taxa de mortalidade média de 44%. Em todos os tratamentos do bioensaio 2 (Ingestão de dieta contendo FHFSRc por operárias de *A. mellifera*) do presente trabalho, o FHFSRc reduziu a probabilidade de

sobrevivência de *A. mellifera* a menos de 75%, indicando que este inseticida botânico à base de *R. communis*, apresentou efeito letal a operárias de *A. mellifera*.

A exposição aguda ou crônica de larvas e adultos de abelhas ao glifosato e suas formulações causaram alterações na capacidade de deslocamento vertical de operárias de *A. mellifera* (BATTISTI et al., 2023). O mesmo pode ser observado nesse trabalho, no qual o deslocamento vertical das abelhas expostas aos tratamentos controle e Tween 80[®] se manteve entre os estratos III e V, estando em média entre o estrato V e o estrato IV. Já os tratamentos contendo FHFSRc diferiram do tratamento controle, mantendo-se sempre abaixo do estrato V e em média entre os estratos III e IV (2%), II (1,5%) e II (1%), indicando interferência direta do FHFSRc no deslocamento vertical das abelhas.

Os efeitos causados pelo FHFSRc a *A. mellifera*, observados neste trabalho podem estar associados à presença de alcaloides e terpenos encontrados na fração hexânica deste extrato (SUN et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (SALOMÉ, 2007; RONSSSEN, 2011). Esses são conhecidos por apresentarem ação deterrente (PETROSKI; STANLEY, 2009), além de ser considerado extremamente tóxico, uma vez que causam efeito letal aos insetos (RONDELLI, 2010; LIMA et al., 2011), bem como, apresentam efeitos subletais, como diminuição do peso de pupas, inibição do desenvolvimento e retardo no crescimento larval além de efeitos subletais, como retardo no crescimento larval (PESSOA et al., 2014). Também afetam o sistema nervoso dos insetos, estando associados a ação de repelência e atração desses (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A FHFSRc causou diminuição na probabilidade de sobrevivência, de *A. mellifera* bem como, alterou as taxas de deslocamento vertical das abelhas, o que pode indicar um efeito subletal associado aos alcaloides presentes. Um alcaloide presente no metabolismo de *R. communis* é a ricina, a qual possui ação inseticida (ALEXANDER et al., 2008; RONDELLI, 2010). A ação tóxica, observada no bioensaio 2 pode ter sido ocasionada pela ricina, pois esta pode atuar impedindo a síntese de proteínas e reduzindo a digestibilidade (BESTETE et al., 2011). Além deste alcaloide, a ricinina e a ricinoleína, também são compostos de ação inseticida encontradas em folhas e sementes de *R. communis* (CAZAL et al., 2009; GAHUKAR, 2017). Estes

compostos podem interferir nos parâmetros biológicos de insetos que entram em contato com a FHFSRc, como ocorreu com operárias de *A. mellifera*.

Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) (SALOMÉ, 2007; RONSSSEN, 2011). Esses apresentam atividade inseticida (VIEGAS JÚNIOR, 2003; WARMLING et al., 2019). Esta ação inseticida pode estar ligada à inibição da acetilcolinesterase, o que provoca ação hormonal, reduzindo a capacidade reprodutiva, inibição ou retardo do crescimento dos insetos, ação antialimentar e repelência (HARMATHA; NAWROT, 2002; VIEGAS JÚNIOR, 2003). Nesta perspectiva, a FHFSRc causa ação de repelência a *A. mellifera*. Esta ação justificaria o fato da concentração intermediária da FHFSRc causar a menor probabilidade de sobrevivência, pressupondo que, concentrações mais altas podem causar efeito de repelência a operárias de *A. mellifera*, diminuindo a busca por alimentos, bem como, reduzindo os movimentos dessas. Entretanto, é necessário averiguar tal fator em estudos sobre a repelência de FHFSRc.

A cromatografia gasosa da fração hexânica de sementes e folhas de *R. communis*, caracterizou quatro ácidos graxos sendo, ácido linolênico (47,76%) (insaturado), ácido linoléico (15,28%) (poli-saturado), ácido palmítico (13,01%) (saturado) e ácido esteárico (1,73%) (saturado) como principais constituintes. Os ácidos linolênico (RAMOS-LÓPEZ, 2012) e linoléico (RAMOS-LÓPEZ et al., 2012, CLEMENTS et al., 2019) apresentam efeito inseticida comprovado. Com base no exposto, verifica-se que o FHFSRc provocou efeitos negativos em *A. mellifera*, seja através do contato das operárias em superfície contaminada ou pela ingestão de alimentos contaminados com o mesmo. Os resultados indicam ainda que, na sua dose basal (1%) houve maior mortalidade de *A. mellifera* do que nas demais concentrações. Uma hipótese a ser investigada é de que as operárias apresentam comportamento de repelência a este inseticida botânico, pois se evidencia comportamento de menor contato de *A. mellifera* em locais com maior concentração da FHFSRc.

Outra hipótese para este fenômeno é a hormese ocorre quando a exposição de um organismo a doses subletais de agentes e estressantes ocasiona melhora ou aumento em funções úteis destes organismos. pela melhora de um organismo (CUTLER e GUEDES, 2017). Esta resposta foi observada em muitos organismos após a exposição a fatores estressores, assim como, estes efeitos foram possivelmente observados em nosso estudo, pois a FHFSRc na concentração mais baixa causou

uma redução maior na taxa de sobrevivência de *A. mellifera* que a maior concentração desta.

Observa-se que a FHFSRc causou em algum nível toxicidade as operárias de *A. mellifera*, seja através do contato com superfície contaminada ou através da alimentação contaminada com o FHFSRc. Destaca-se ainda que, este inseticida botânico apresentou danos tanto na sobrevivência quanto no comportamento destas abelhas, diminuindo a probabilidade de sobrevivência e afetando diretamente o deslocamento vertical dessas. Assim, pode-se afirmar que a fração hexânica do extrato de *R. communis* é tóxica a *A. mellifera*. Entretanto, é importante analisar qual é o grau de toxicidade deste inseticida para *A. mellifera* e para os demais insetos não-alvos.

Para *A. mellifera* recomenda-se outros testes, tais como, testes para averiguar a repelência deste inseticida botânico em análises de preferência alimentar, análises de caminhamento em superfície contaminada, contato direto com o inseticida botânico, análises sobre a interferência do FHFSRc no forrageamento destas, testes em campo, análise da produção de rainhas, bem como, análises das possíveis alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares ocasionados a *A. mellifera*. Para outros insetos não-alvo, indica-se utilizar dos mesmos métodos testados nesse trabalho, afim de aferir a toxicidade deste inseticida botânico. Em novos testes, recomenda-se ainda, utilizar inseticidas químicos sintéticos e/ou inseticidas botânicos já comercializados, como controle positivo, a fim de aferir o grau de toxicidade da FHFSRc comparado a um inseticida com estes parâmetros já definidos.

Há que se destacar que não existe metodologias padronizadas para testes em insetos, especialmente para polinizadores, quando fala-se de inseticidas botânicos, por isso, a maioria dos trabalhos realizados com esses, possuem metodologias de aplicação parecidas, mas não padronizadas (MOREIRA et al., 2006; COSME; CARVALHO; MOURA, 2007; BRAGA SILVA et al., 2019;). Este trabalho contribui para a padronização de metodologias de aplicação sobre abelhas, usando como tratamento inseticidas botânicos.

Ainda, apesar dos inúmeros estudos referentes aos efeitos tóxicos dos inseticidas botânicos a insetos praga, pouco se fala sobre os efeitos desses a organismos não-alvo como abelhas (PINHEIRO et al., 2019; TELLES et al., 2020; TOLOU et al., 2022) e parasitoides (KAUR, et al. 2021; BESTETE, et al., 2011; MARQUES, 2015). Ainda, quando se fala de FHFSRc, pode-se citar apenas trabalhos

referentes à aplicação desses no controle de insetos-praga (SOTELO-LEYVA et al., 2020). Entretanto, não existem trabalhos que relatam o efeito da FHFSRc sobre operárias de *A. mellifera*.

Para evitar que as operárias de *A. mellifera* sejam afetadas pela FHFSRc a campo, algumas estratégias de aplicação devem ser tomadas. Para melhor definir essas estratégias, deve-se levar em consideração o comportamento das abelhas a campo. Neste sentido, dois principais pontos devem ser elencados. O primeiro ponto a ser considerado é o período de floração da cultura, uma vez que neste período um maior número de operárias de *A. mellifera* estarão à procura de pólen. O segundo ponto a ser considerado é o horário de maior visitação floral, que ocorre durante o dia. Assim, a aplicação adequada deve ser realizada ao final do dia, em períodos em que a cultura não esteja em floração (MARTINHO et al., 2022).

3.6 Conclusão

A fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* é tóxica a operárias de *A. mellifera*, causa redução na probabilidade de sobrevivência e interfere negativamente no deslocamento vertical destas.

4. CAPÍTULO II - *Gallus gallus domesticus* (GALLIFORMES: PHASIANIDAE) COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ANÁLISE DE BIOSSEGURANÇA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE FRUTOS E SEMENTES DE *Ricinus communis* L. (MALPIGHIALES: EUPHORBIACEAE)

4.1 Introdução

Atrelada à expansão agrícola do último século está a preocupação com as pragas presentes nos cultivos. Esta expansão, conseqüentemente, aumenta também a quantidade de agrotóxicos utilizados para controle destas pragas (MARTINEZ et al., 2017). Entretanto, muitos são os fatores que tornam os agrotóxicos um risco eminente à saúde humana, como a forma de aplicação, ou a frequência exacerbada do uso. Acarretando inclusive, muitas vezes, em danos genéticos e físicos a saúde do homem (RIBAS; MATSUMURA, 2009; MILDEMBERG, 2017; MARCELINO, WACHTEL, GHISI, 2019).

Com isto, busca-se minimizar o uso exacerbado de agrotóxicos sintéticos através do emprego de outros métodos de controle de insetos-praga. Dentre estes métodos os inseticidas botânicos ganham cada vez mais destaque uma vez que podem apresentar maior seletividade e baixa toxicidade aos organismos presentes nos agroecossistemas (GOULART et al., 2015; COSTA DANTAS et al., 2019).

Os inseticidas botânicos são substâncias provenientes do metabolismo de plantas, seja ele o metabolismo primário ou o metabolismo secundário. O metabolismo primário das plantas é essencial para a produção dos metabólitos básicos necessários para o desenvolvimento da planta tais como carboidratos, aminoácidos, lipídios e nucleotídeos. Já o metabolismo secundário de plantas, não é considerado essencial para a produção de metabólitos básicos para o desenvolvimento da planta (WIESBROOK, 2004; GARCÍA e CARRIL, 2009; PACHECO BORGES, AMORIM, 2020). Dessa forma, os metabólitos secundários agem na defesa da planta, como repelentes, inibidores da alimentação e/ou mortalidade dos insetos (SAITO, 2004; SANTANA et al., 2022).

Quando se fala em inseticidas botânicos o extrato de vegetal de mamona tem sido estudado para tal uso (CUNHA et al. 2006). A planta *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) possui metabólitos secundários que incluem compostos flavonoides (SUN et al., 2011; ZHANG et al., 2011), esteróis (SUN et al., 2011), terpenos (PERES et al., 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ e FERNÁNDEZ, 2011; YEBOAH, et al., 2020) responsáveis por causar danos ao

desenvolvimento, ciclo biológico, ou até levar os insetos à morte, o que torna este extrato uma alternativa para o controle de insetos (WARMLING et al., 2019). Entretanto, são poucos os trabalhos abordando os efeitos letais ou subletais deste inseticida botânico em organismos não-alvo. Tendo em vista que a biossegurança é um fator determinante na escolha pela implantação ou não de novos inseticidas botânicos, faz-se necessário testar tais produtos em modelos biológicos (MARAGONI et al., 2012).

O embrião de ave é um modelo biológico de suma importância para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário das aves são semelhantes aos mesmos estágios do desenvolvimento embrionário humano, principalmente durante a organogênese (IRIE; KURATANI, 2011). Na embriologia comparada, os embriões de ave ganham destaque devido a algumas condições favoráveis destes, como o fato de os ovos serem do tipo megalécito, permitindo seu desenvolvimento completo em laboratório; o curto tempo de desenvolvimento total; bem como, o fato de os embriões se desenvolverem sem a presença materna, externamente ao organismo da progenitora, evitando assim a exposição desta a incontáveis manipulações ou até a morte (BARBOSA, KAWANO, 1995; SCHOENWOLF, 1999). Além disso, a descrição do desenvolvimento embrionário completo de *Gallus gallus domesticus* (Galliformes: Phasianidae) é encontrada facilmente na literatura (HAMBURGER E HAMILTON, 1951).

A ave mais utilizada em estudos de laboratório é a espécie *G. gallus domesticus*. Assim, a análise dos efeitos de *R. communis* a *G. gallus domesticus*, buscou verificar a toxicidade deste inseticida botânico ao vertebrado em questão e prospectar os resultados obtidos. Desta forma, no presente trabalho, analisou-se a biossegurança da fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* utilizando o modelo biológico *G. gallus domesticus* em seu desenvolvimento embrionário inicial.

4.2 Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle Biológico (LABCON) localizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Dois Vizinhos (UTFPR). Este trabalho encontra-se registrado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UTFPR), sob o certificado de número 2018-40/2018- CEUA, processo 23064.046670/2018-61.

4.2.1 Obtenção da FHFSRc e do embrião de *G. gallus domesticus*

A FHFSRc foi preparada a partir dos frutos inteiros. Esses foram coletados em área de vegetação nativa. O material vegetal coletado permaneceu em secagem à sombra por, aproximadamente, 24 h temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Na sequência, foi colocado em papel Kraft (60 X 80 cm), permanecendo em estufa de secagem de circulação forçada por 48 h a 60°C , conforme Allein (2021).

Após a secagem e avaliação do peso, dos frutos e das sementes de *R. communis*, realizou-se a trituração em moinho de facas tipo Willey (ALPAX), até que toda a massa vegetal estivesse como um pó com granulometria de, aproximadamente, 0,5 mm. Em seguida, dilui-se 20 g deste pó em 200 mL de álcool 80%, em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Essa mistura foi colocada em banho de água termostaticado a 60°C , por 30 minutos. Posteriormente, o produto obtido foi filtrado em um balão Kitasato, com membrana filtrante de 8μ , marca UNIFIL, com o auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE058), em pressão constante de $1,2 \text{ kgf/cm}^2$.

Após a filtração, o produto foi submetido ao processo de rotaevaporação, em evaporador rotativo (MARCONI – MA 120), sob temperatura entre 55 a 60°C , acoplado a uma bomba de vácuo sob pressão constante de $0,35 \text{ kgf/cm}^2$ para a retirada do álcool 80%. Após isso, os compostos restantes foram resuspendidos em água destilada atingindo o volume de 200 mL, denominado extrato bruto.

O extrato bruto foi fracionado por meio da técnica de extração líquido-líquido (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Com o auxílio de um funil de separação com capacidade volumétrica de 1.000 mL colocou-se o volume de 250 mL do extrato bruto de *R. communis* e 250 mL do extrator hexano. A mistura foi agitada manualmente por cerca de um minuto para obter maior homogeneização e após 15 minutos de repouso, ocorreu a separação de duas frações desse extrato. O extrato bruto ficou depositado na parte inferior do funil e a fração hexânica na parte superior, sendo coletada a parte de interesse através da torneira do funil de separação. A fração hexânica foi

novamente encaminhada para o evaporador rotativo (MARCONI – MA 120) em temperatura de 42 a 45°C, para a remoção completa dos solventes, obtendo-se assim a fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* (FHFSRc) utilizada neste trabalho. A FHFSRc ainda foi diluída em Tween 80® a 0,01% para se obter as concentrações padrão para o experimento, sendo de 1%, 1,5% e 2% (VIEIRA, 2020).

Ovos fertilizados utilizados foram da espécie *G. gallus domesticus* com peso entre 60 e 65 g e sem rachaduras. Os ovos foram adquiridos em um incubatório comercial regional. Ao chegar ao LABCON os ovos foram higienizados com papel toalha, umedecido em álcool etílico 70%, e identificados de acordo com os tratamentos citados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos tratamentos e sua respectiva forma de exposição, utilizados para avaliar o efeito de *Ricinus communis* sobre a sobrevivência e morfometria em *Gallus gallus domesticus*

Tratamentos	Composição	Exposição
Tratamento 1 (T1)	1% da FHFSRc + 99% de Tween®80 a 0,01%	Pulverização
Tratamento 2 (T2)	1,5% da FHFSRc + 98,5% de Tween®80 a 0,01%	Pulverização
Tratamento 3 (T3)	2% da FHFSRc + 98% de Tween®80 a 0,01%	Pulverização
Tratamento 4 (T4)	1% da FHFSRc + 99% de Tween®80 a 0,01%	injeção na câmara de ar
Tratamento 5 (T5)	1,5% da FHFSRc + 98,5% de Tween®80 a 0,01%	injeção na câmara de ar
Tratamento 6 (T6)	2% da FHFSRc + 98% de Tween®80 a 0,01%	injeção na câmara de ar
Tratamento 7 (T7)	Controle fechado	-
Tratamento 8 (T8)	Solução de Tween®80 a 0,01%	Pulverização
Tratamento 9 (T9)	Solução de Tween®80 a 0,01%	injeção na câmara de ar

Fonte: Autoria Própria (2022)

4.2.2 Bioensaios com *G. gallus domesticus* e método de exposição

Este desenho experimental foi dividido em nove tratamentos. Para cada tratamento foram utilizados 60 ovos, totalizando 540 ovos para cada meio de exposição. Os embriões foram submetidos a dois diferentes tipos de exposição, sendo o primeiro através de injeções feitas diretamente na câmara de ar do ovo, e a segunda sendo a pulverização utilizando um aerógrafo.

Para a exposição por injeção os embriões foram expostos às concentrações estabelecidas anteriormente, diretamente na câmara de ar, local que permite melhor dispersão dos agentes no embrião. Para a injeção dos tratamentos foi utilizado uma agulha (1,60 x 40 mm) para perfurar a casca, e com seringa e agulha de insulina (0,3 x 8 mm) injetado o volume de 100 µL dos tratamentos diretamente na câmara de ar (Figura 10) (YAMAMOTO et al., 2012). Esta é uma metodologia padrão utilizada em embriões de *G. gallus domesticus* (KORN; CRAMER, 2007; YAMAMOTO et al., 2012). Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, evitando assim o contato do conteúdo interno do ovo com o ambiente. Em sequência os ovos foram posicionados com a câmara de ar voltada para cima na bandeja presente na incubadora e incubados por três dias, sob temperatura controlada a 38°C e umidade e ventilação constantes (Figura 11).

Para a exposição do tipo pulverização, os ovos foram expostos a pulverização de 290 µL dos tratamentos utilizando um aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Tecnal® (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm). Este procedimento simula condições de campo, na qual ovos de vertebrados possam estar expostos no momento da pulverização. Após a pulverização foram acondicionados em câmara de fluxo laminar horizontal para evaporar todos os líquidos da solução. Na sequência, os ovos foram posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados por três dias, sob temperatura controlada a 38°C e umidade e ventilação constantes.

Figura 10: Injeção da FHFSRc na câmara de ar de ovos de *Gallus gallus domesticus*



Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 11: Ovos de *Gallus gallus domesticus* com a câmara de ar voltada para cima na bandeja no interior da incubadora



Fonte: Autoria Própria (2022)

4.2.2.1 Análise da Viabilidade

Depois dos três dias de incubação os embriões foram coletados e no topo da câmara de ar foi realizada a abertura da casca para a visualização do embrião, com o auxílio de tesoura. Uma pequena porção do albúmen foi retirado para melhor visualização dos embriões (Figura 12), então, um papel filtro retangular, com um recorte em losango na região central foi encaixado sobre o embrião para mantê-lo distendido (Figura 13).

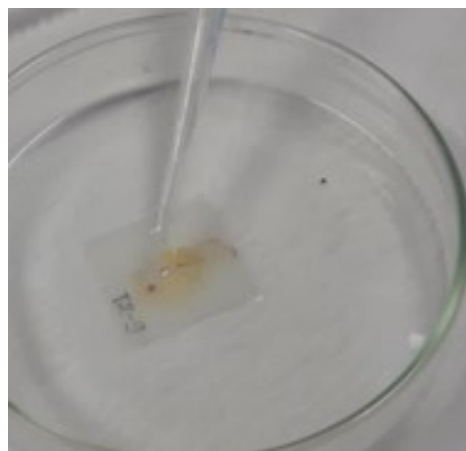
Estes embriões foram primeiramente classificados como viáveis ou inviáveis. Embriões viáveis apresentavam desenvolvimento embrionário, mesmo que estes embriões estivessem posteriormente mortos. Embriões inviáveis não apresentavam nenhum resquício embrionário.

Figura 12: Abertura da casca do ovo de *Gallus gallus domesticus* com visualização do embrião em desenvolvimento



Fonte: Aatoria Própria (2022)

Figura 13: Embrião de *Gallus gallus domesticus* distendido e sobreposto ao retângulo de papel



Fonte: Aatoria Própria (2022)

4.2.2.2 Análise da Sobrevivência

Nesta análise os embriões foram classificados como vivos ou mortos. Os embriões foram considerados vivos quando apresentaram batimentos cardíacos e, considerados mortos quando não apresentaram batimentos cardíacos, ou quando apresentaram coágulos sanguíneos. Os embriões considerados vivos foram então contabilizados e, em sequência, foi realizada a análise de batimentos cardíacos. Os embriões mortos foram contabilizados para a análise de mortalidade e posteriormente descartados.

4.2.2.3 Análise de Batimentos Cardíacos

Após a identificação dos embriões vivos foi realizada a identificação do coração do embrião e, em sequência, foram cronometrados 15 segundos, nos quais os batimentos cardíacos foram contabilizados. Posteriormente, todos os batimentos cardíacos registrados foram multiplicados por 4 para verificar o número de batimentos por minuto.

4.2.2.4 Análise do desenvolvimento embrionário e análise morfológica

Ainda no mesmo dia (três dias após a incubação) os embriões de *G. gallus domesticus* vivos foram eutanasiados através de congelamento, seguindo as normas do CONCEA (2013). Este procedimento foi realizado para a análise de

desenvolvimento embrionário e para análise morfológica através da técnica de montagem total (YAMAMOTO et al., 2012). Para esta técnica foi gotejada solução fixadora Carnoy e com o auxílio de pinça e tesoura, 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. Na sequência os embriões foram transferidos novamente da placa de Petri para um Ksete, previamente identificado com os dados do embrião em questão.

Os embriões foram então fixados em Carnoy, por 2 horas, à temperatura ambiente, em placa de Petri fechada. Depois, foram lavados em água destilada e colocados em álcool etílico 70%, onde permaneceram por, no mínimo, 8 horas. 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 (70%, 90% e 95% por 10 minutos em cada, 100% I e 100% II por 15 minutos em cada) e diafanizados com dois banhos de xilol (xileno) Pa Acs (10 minutos em cada). Para a montagem das lâminas foi utilizado o bálsamo do Canadá sintético e lamínula.

Para a análise e determinação dos estágios do desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus* submetidos aos diferentes tratamentos. Foram levados em consideração o tamanho dos brotos das asas e das pernas, além do tamanho e curvatura da cauda, e tamanho da cabeça em relação ao corpo, seguindo a descrição realizada por Hamburger e Hamilton (1951). Ainda segundo Hamburger e Hamilton (1951), após 72h de incubação os estágios embrionários comuns são entre 16 e 19.

Para a análise morfológica dos embriões de *G. gallus domesticus* foram analisadas as lâminas feitas através da técnica de montagem total de embriões. Essas lâminas foram analisadas uma a uma, verificando as estruturas corpóreas em busca da identificação de malformações embrionárias, quando pertinente foi realizado o registro fotográfico em microscópio estereoscópico (Zeiss, Stemi – 305) acoplado em uma câmera (AxioCam ERc 5s) e utilizando o software ZEN 2.3 LITE, de acordo com os estágios descritos por HAMBURGER e HAMILTON (1951).

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos através dos experimentos com embriões de *Gallus gallus domesticus* foram ajustados pelo método da máxima verossimilhança. Em seguida foram aplicados a uma análise de deviança e em sequência foi submetido ao Testes

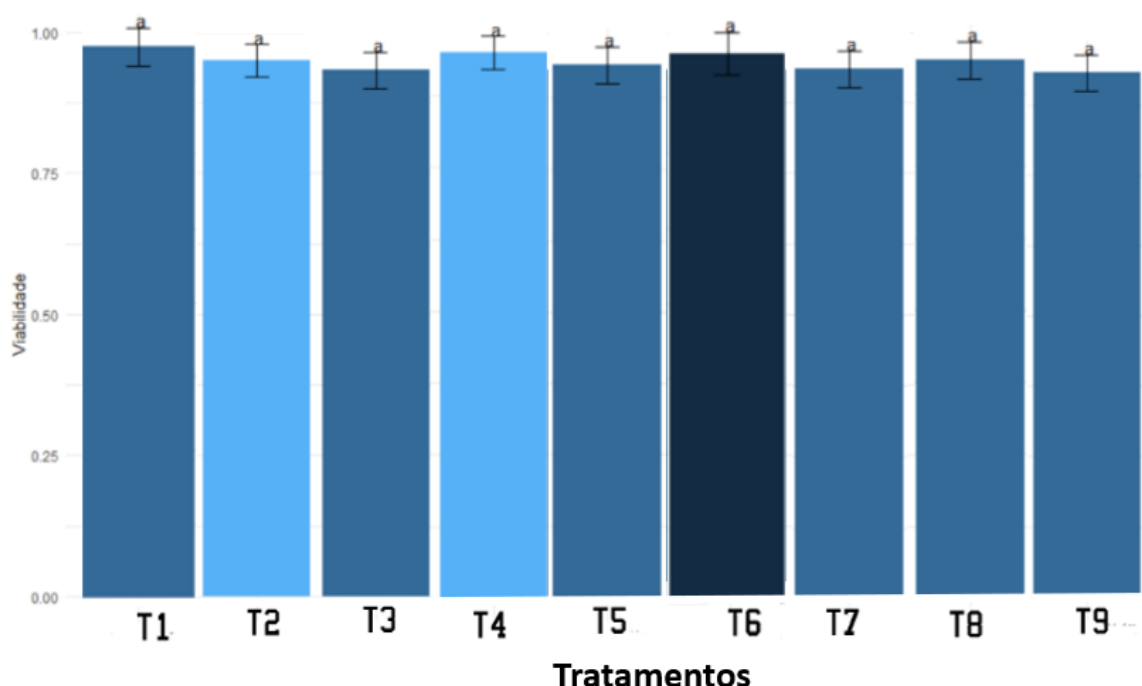
de comparações duas a duas (Tukey). Para a análise dos estágios embrionários foi aplicado um teste de Kruskal wallis e posteriormente foi aplicado um teste de comparação de medianas (teste de Dunn). Para esta análise estatística, foi utilizado o software Rstudio ((R Core Team, 2022).

4.4 Resultados

4.4.1 Análise de Viabilidade

Não houve alterações na viabilidade dos embriões de *G. gallus domesticus* submetidos aos diferentes tratamentos (Gráfico 6). A taxa de viabilidade permaneceu entre 90 e 100%.

Gráfico 6: Viabilidade dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos as diferentes concentrações de FHFSRc



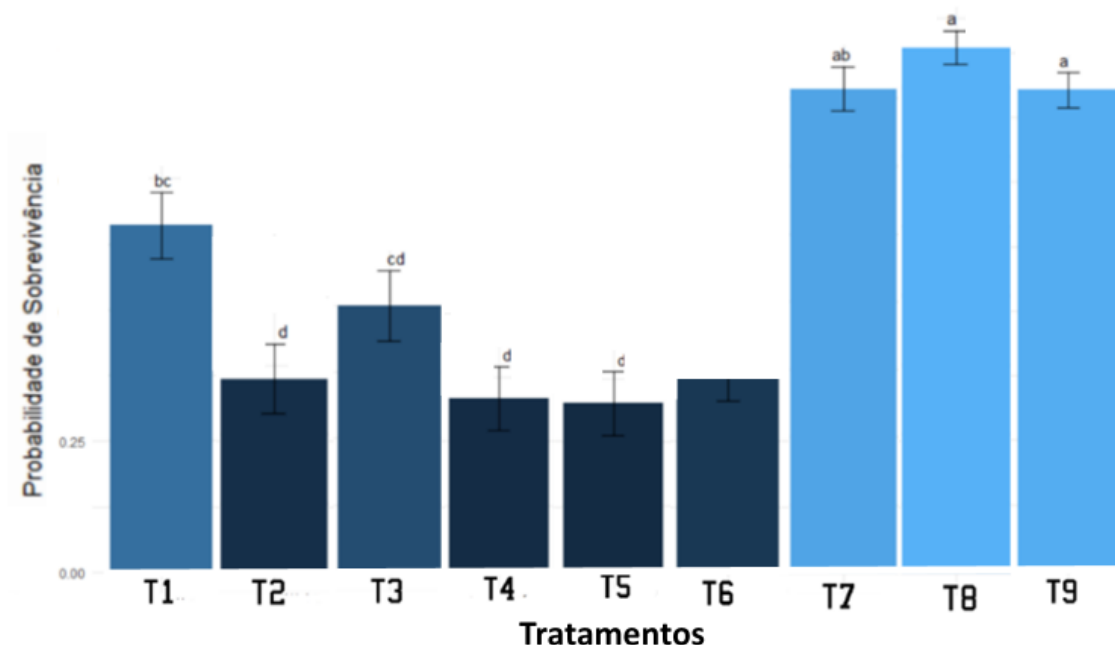
Fonte: Autoria Própria (2022)

T1: 1% da FHFSRc (pulverização); T2: 1,5% da FHFSRc (pulverização); T3: 2% da FHFSRc (pulverização); T4: 1% da FHFSRc (injeção); T5: 1,5% da FHFSRc (injeção); T6: 2% da FHFSRc (injeção); T7: Controle fechado; T8: Solução de Tween®80 a 0,01% (pulverização); T9: Solução de Tween®80 a 0,01%(injeção).

4.4.2 Análise de sobrevivência

Os tratamentos T6 (injeção de 2% da FHFSRc), T4 (injeção de 1% da FHFSRc), T2 (pulverização de 1,5% da FHFSRc), T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) e T3 (pulverização de 2% da FHFSRc) reduziram a probabilidade de sobrevivência de *G. Gallus*, diferindo significativamente dos, T7 (controle fechado), T8 (pulverização de Gráfico 7).

Gráfico 7: Probabilidade de sobrevivência dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc



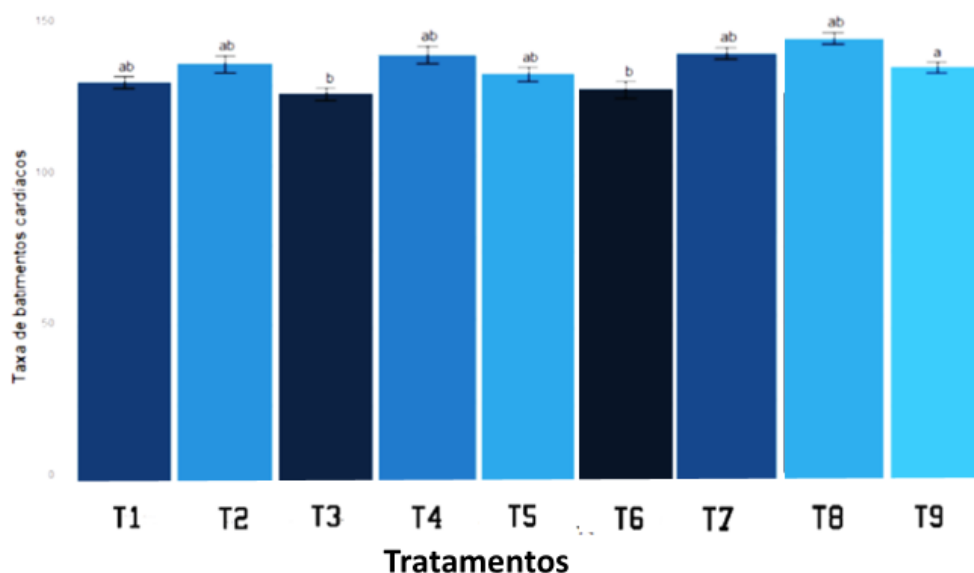
Fonte: Autoria Própria (2022)

T1: 1% da FHFSRc (pulverização); T2: 1,5% da FHFSRc (pulverização); T3: 2% da FHFSRc (pulverização); T4: 1% da FHFSRc (injeção); T5: 1,5% da FHFSRc (injeção); T6: 2% da FHFSRc (injeção); T7: Controle fechado; T8: Solução de Tween®80 a 0,01% (pulverização); T9: Solução de Tween®80 a 0,01%(injeção).

4.4.3 Análise de batimentos cardíacos

A média de batimentos cardíacos de embriões de *G. gallus domesticus*, submetidos aos diferentes tratamentos, foi de 131. Houve uma redução discreta nos batimentos cardíacos dos embriões oriundos dos tratamentos T3 (pulverização de 2% da FHFSRc) e T6 (injeção de 2% da FHFSRc) em relação aos oriundos ao tratamento T8 (pulverização de Solução de Tween®80 a 0,01%) (Gráfico 8). Entretanto, nenhum tratamento provocou redução significativa quando comparado ou T7 (controle fechado).

Gráfico 8: Taxa de batimentos cardíacos dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc



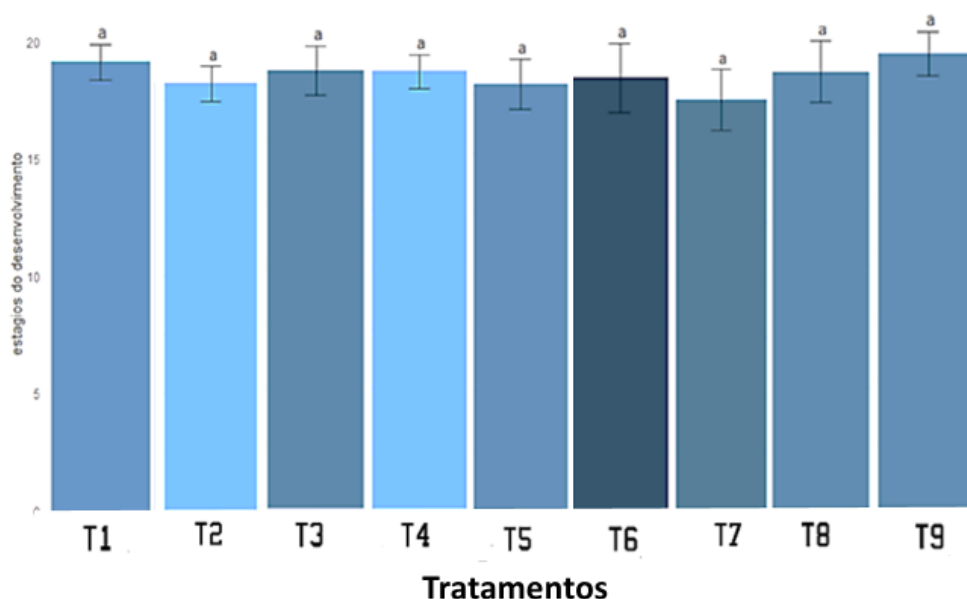
Fonte: Autoria Própria (2022)

T1: 1% da FHFSRc (pulverização); T2: 1,5% da FHFSRc (pulverização); T3: 2% da FHFSRc (pulverização); T4: 1% da FHFSRc (injeção); T5: 1,5% da FHFSRc (injeção); T6: 2% da FHFSRc (injeção); T7: Controle fechado; T8: Solução de Tween®80 a 0,01% (pulverização); T9: Solução de Tween®80 a 0,01%(injeção).

4.4.4 Análise do desenvolvimento embrionário e análise morfológica

Observa-se que em todos os tratamentos os embriões de *G. gallus domesticus* apresentaram a mesma variação nos estágios do desenvolvimento, estando todos entre o estágio 17 e 20 (Gráfico 9), não ocorrendo alterações em decorrência dos tratamentos analisados.

Gráfico 9: Estágios do desenvolvimento dos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc

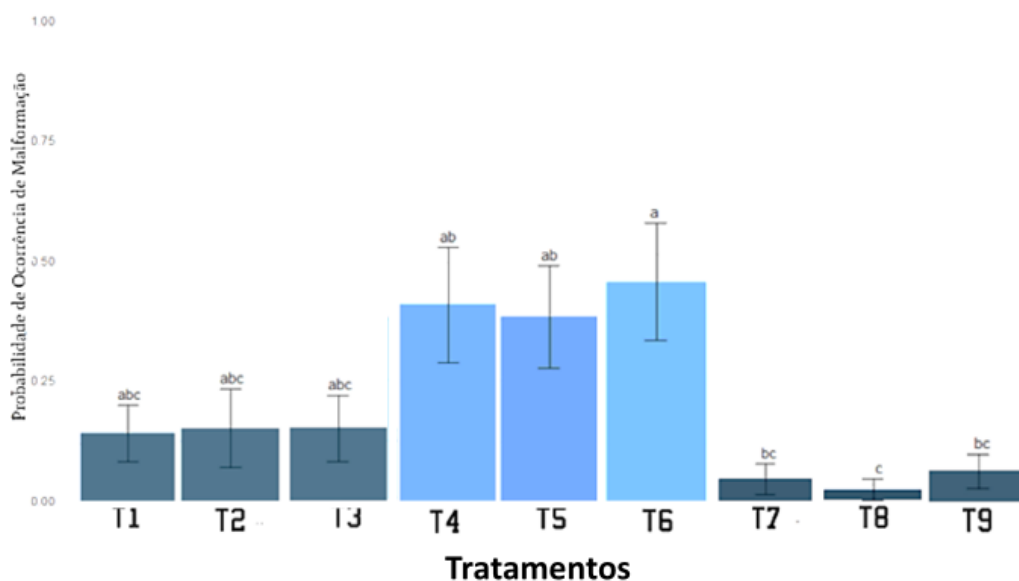


Fonte: Autoria Própria (2022)

T1: 1% da FHFSRc (pulverização); T2: 1,5% da FHFSRc (pulverização); T3: 2% da FHFSRc (pulverização); T4: 1% da FHFSRc (injeção); T5: 1,5% da FHFSRc (injeção); T6: 2% da FHFSRc (injeção); T7: Controle fechado; T8: Solução de Tween®80 a 0,01% (pulverização); T9: Solução de Tween®80 a 0,01% (injeção).

Os embriões de *G. gallus domesticus* expostos aos tratamentos T6 (injeção de 2% da FHFSRc), T4 (injeção de 1% da FHFSRc) e T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) apresentaram probabilidade de ocorrência de malformação entre 25 e 50%, diferindo significativamente dos embriões oriundos do tratamento T8 (pulverização de Solução de Tween®80 a 0,01%). Os embriões expostos aos tratamentos T2 (pulverização de 1,5% da FHFSRc), T3 (pulverização de 2% da FHFSRc) e T1 (pulverização de 1% da FHFSRc) apresentaram uma probabilidade de ocorrência de malformação entre 10% a 25%. Enquanto os embriões expostos aos tratamentos controle T9 (injeção de Solução de Tween®80 a 0,01%), T7 (controle fechado) e T8 (pulverização de Solução de Tween®80 a 0,01%), apresentaram probabilidade de ocorrência de malformações a baixo de 10%, diferindo significativamente dos embriões que receberam o tratamentos T6 (injeção de 2% da FHFSRc), conforme Gráfico 10.

Gráfico 10: Probabilidade de ocorrência de malformação nos embriões de *Gallus gallus domesticus* submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de FHFSRc

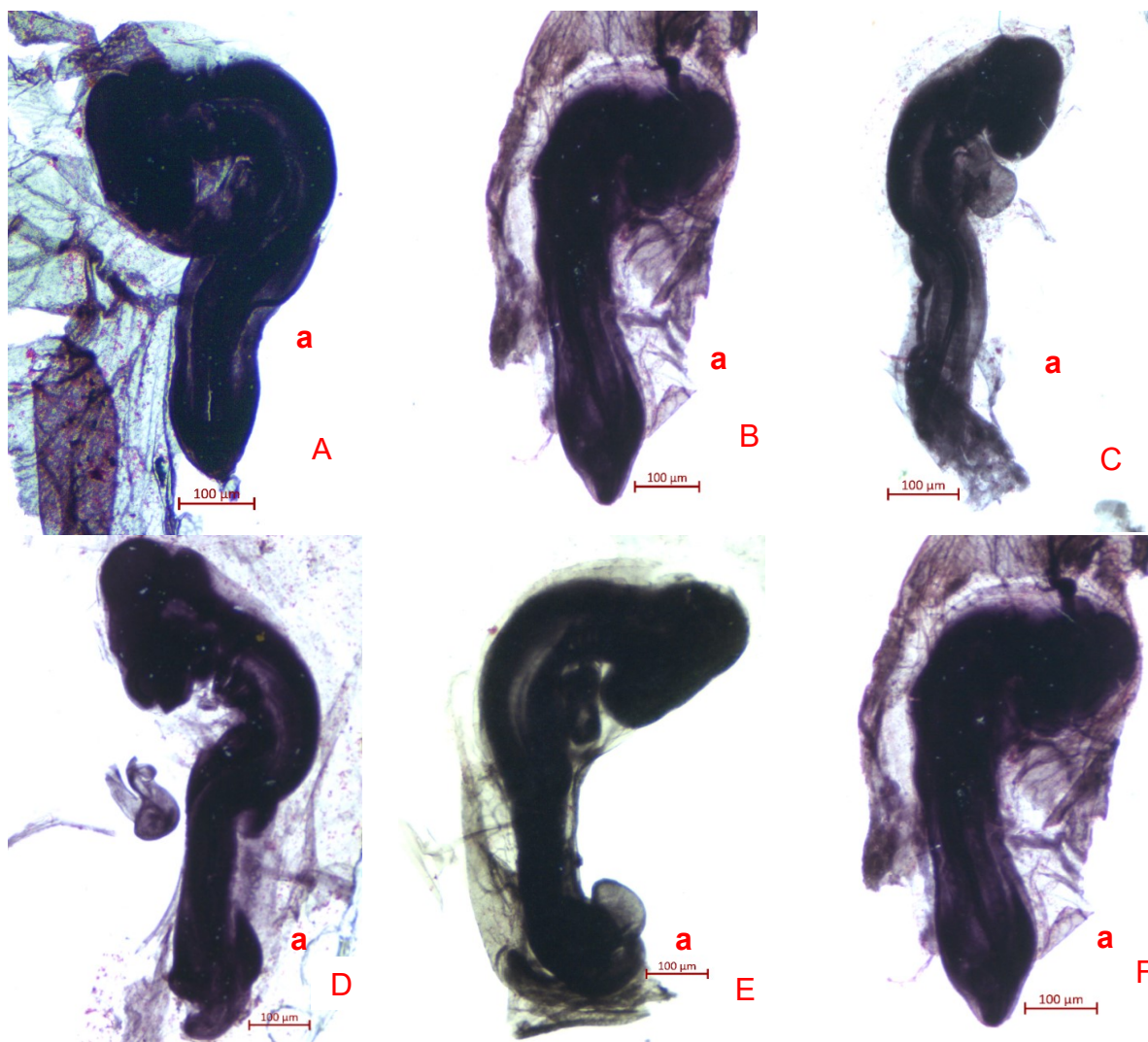


Fonte: Autoria Própria (2022)

T1: 1% da FHFSRc (pulverização); T2: 1,5% da FHFSRc (pulverização); T3: 2% da FHFSRc (pulverização); T4: 1% da FHFSRc (injeção); T5: 1,5% da FHFSRc (injeção); T6: 2% da FHFSRc (injeção); T7: Controle fechado; T8: Solução de Tween@80 a 0,01% (pulverização); T9: Solução de Tween@80 a 0,01% (injeção).

Em todos os tratamentos, no mínimo mais de 50% dos embriões de *G. gallus domesticus* estavam com a morfologia intacta (Figura 14). A região encefálica, apresentou apenas uma malformação identificada, sendo essa a falha na divisão das vesículas encefálicas, observada em um embrião de *G. gallus domesticus*, submetido ao tratamento T6 (injeção de FHFSRc 2%). Houve embriões com malformações extensas em todos os tratamentos, a maioria sendo impossível identificar suas estruturas ou determinar seu estágio embrionário, além de conter um embrião com o corpo em gama (dois corpos e uma cabeça), no tratamento T7 (controle fechado) (Figura 15).

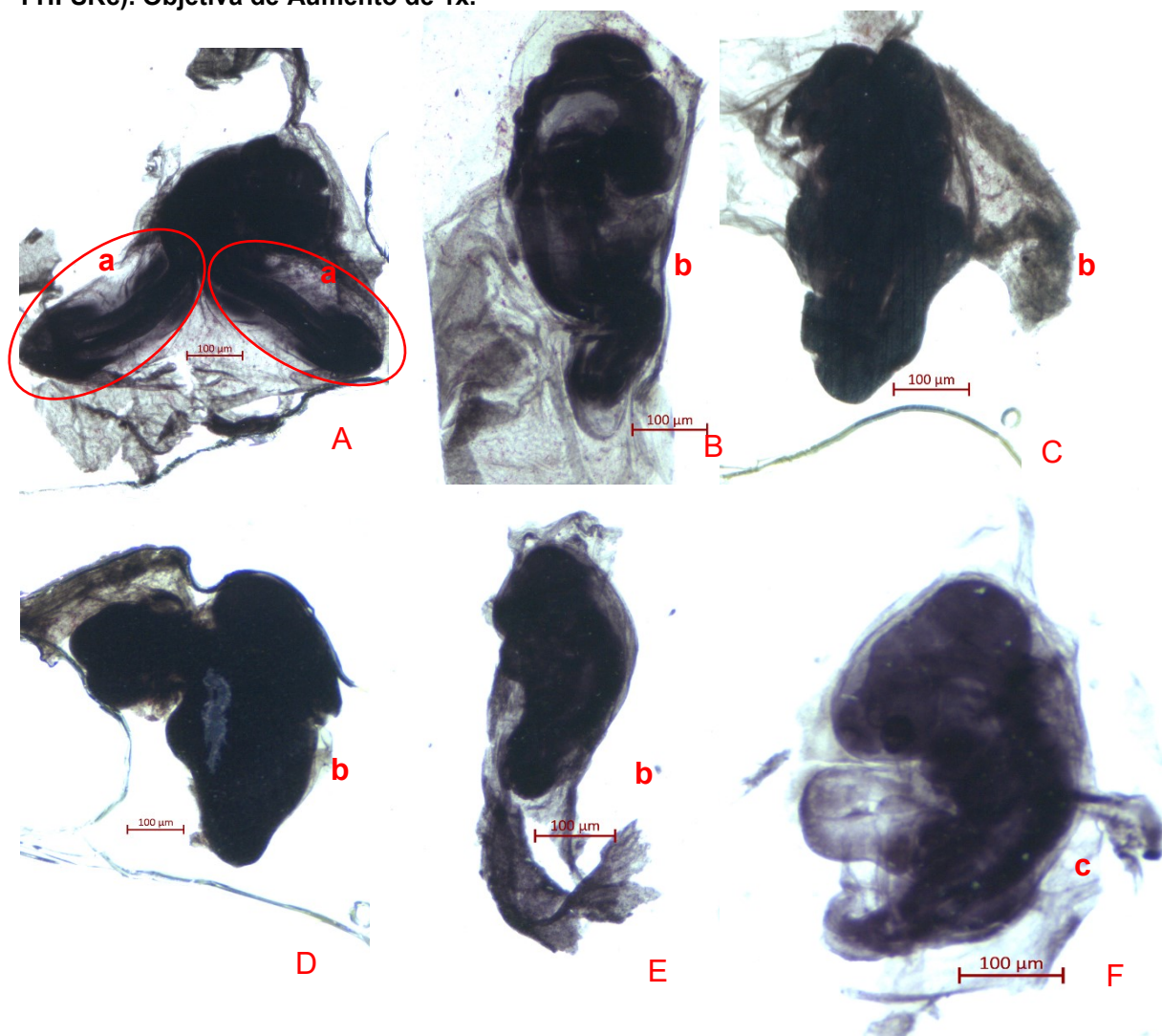
Figura 14: Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* considerados normais. A) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 18; B) Embrião do T8 (pulverização de solução de Tween®80 a 0,01) em estágio 17; C) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 17; D) Embrião do T9 (injeção de Solução de Tween®80 a 0,01) em estágio 18; E) Embrião do T2 (pulverização de 1,5% da FHFSRC) em estágio 19; F) Embrião do T1 (pulverização de 1% da FHFSRC) em estágio 17. Aumento final de 10x.



Fonte: Autoria Própria (2022)

a: Embrião de *G. gallus domesticus* considerado normal.

Figura 15: Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações extensas. A) Embrião do T7 (controle fechado) em estágio 17; B) Embrião do T4 (injeção de 1% da FHFSRc); C) Embrião do T6 (injeção de 2% da FHFSRc); D) Embrião do T5 (injeção de FHFSRc 1,5%); E) Embrião do T1 (pulverização de 1% da FHFSRc); F) Embrião do T6 (injeção de 2% da FHFSRc). Objetiva de Aumento de 1x.

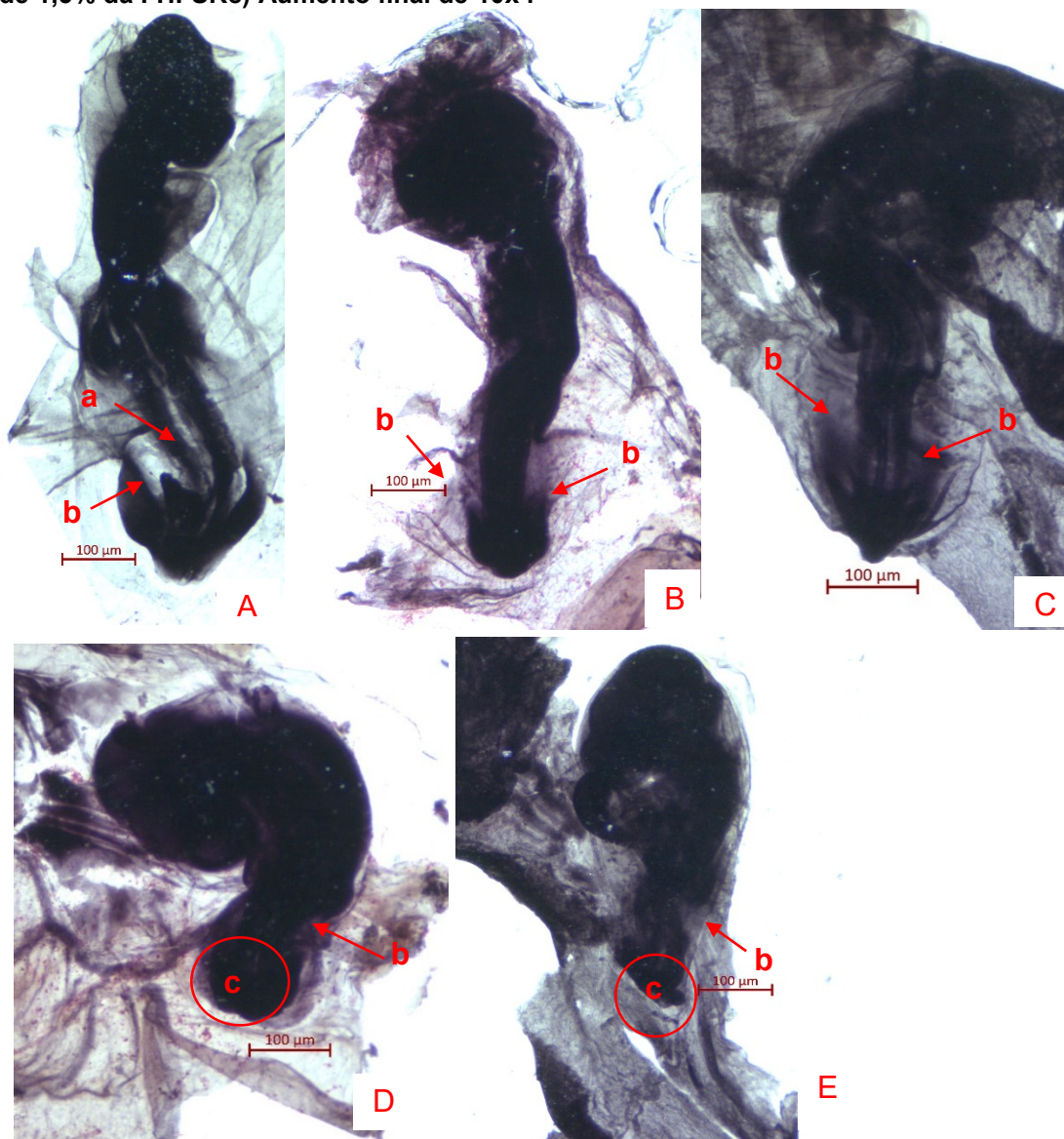


Fonte: Autoria Própria (2022)

a: Corpo Gama (dois corpos e uma cabeça); b: Corpo totalmente malformado; c: Corpo com atrofia caudal e falha na divisão das vesículas encefálicas.

A maioria das malformações encontradas em todos os grupos foram as relacionadas à região corporal e caudal dos embriões. Houve duas principais malformações encontradas: i) a falha no fechamento lateral e caudal do corpo, caracterizando gastrosquise e ii) a atrofia caudal, caracterizada pelo encurtamento da cauda do embrião sendo esta a malformação mais encontrada. Ainda foram encontradas falhas no fechamento do tubo neural, denominadas de raquisquise (Figura 16).

Figura 16: Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações na região corporal e caudal. A) Embrião do T3 (pulverização de 2% da FHFSRc) em estágio 18; B) Embrião do T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) estágio 17; C) Embrião T6 (injeção de 2% da FHFSRc) estágio 17; D) Embrião do T1 (pulverização de 1% da FHFSRc); E) Embrião do T5 (injeção de 1,5% da FHFSRc) Aumento final de 10x .



Fonte: Autoria Própria (2022)

a: corpo apresentando raquisquise; b: corpo apresentando gastrosquise; c: corpo com atrofia caudal.

4.5 Discussão

Os embriões de aves são sensíveis a ações de fatores externos potencialmente teratogênicos. Fatores teratogênicos são quaisquer substância, organismo, agente físico ou estado de deficiência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (DICKE, 1989, KMECICK, 2018). Assim, os resultados obtidos através da exposição destes embriões a possíveis agentes teratogênicos podem evidenciar os efeitos destes agentes no desenvolvimento embrionário de vertebrados, o que pode ser observado em testes de embriotoxicologia, como o realizado para FHFSRc sobre *G. gallus domesticus*.

Quando se fala de trabalhos com embriões de *G. gallus domesticus*, um fator fundamental para validar o experimento é a viabilidade dos embriões, uma vez que, havendo uma alteração significativa dessa, o experimento como um todo estará comprometido. Neste trabalho, não houve alterações significativas na viabilidade dos embriões de *G. gallus domesticus*, obtendo-se taxa de viabilidade entre 90 e 100%, valores considerados adequados para tais experimentos. Corroborando com isso, ovos de *G. gallus* expostos a filtrados de crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Polyporales: Ganodermataceae) não apresentaram diferenças significativas na viabilidade, apresentando taxas entre 75% e 100% (CRUZ, et al., 2021).

Por outro lado, o FHFSRc reduziu a taxa de sobrevivência dos embriões de *G. gallus domesticus* nos tratamentos realizados com a injeção deste inseticida botânico na câmara dos ovos, forma comumente utilizada em pesquisas com este modelo biológico. Nos tratamentos com a pulverização da FHFSRc na casca do ovo, metodologia inovadora empregada a fim de simular uma possível contaminação de ovos de aves e demais vertebrados presentes nos agroecossistemas também se observou redução na probabilidade de sobrevivência de embriões de *G. gallus domesticus*. Mesmo assim, a probabilidade de sobrevivência é maior, quando comparada à injeção da FHFSRc (contaminação interna). Testes com outros bioinsumos, como o extrato vegetal de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poales: Poaceae) (citronela), em sua concentração mais alta, provocou 50% de mortalidade a *G. gallus domesticus* (GALVÃO et al. 2019). Esses valores são semelhantes aos observados no presente trabalho, quando a FHFSRc foi injetada na câmara do ovo. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae), também

provocou mortalidade aos embriões dessa mesma espécie, chegando a 30%. Em contraponto, ao apresentado nestes trabalhos os ovos de *G. gallus domesticus* quando expostos aos extratos de *G. lucidum* não apresentaram diferenças significativas quanto a sobrevivência entre os tratamentos com o extrato e os tratamentos controle (CRUZ, et al., 2021).

Alguns inseticidas botânicos são considerados teratogênicos e outros ainda são considerados tóxicos a embriões. O extrato de *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiales: Lamiaceae), aplicado em fêmeas prenhas de ratos Wistar, em seu formato hidroalcoólico, na dose mais alta diária, causou desenvolvimento fetal retardado e um efeito anti-implantação, o que ocasiona a morte do embrião, além de, em estágios mais avançados da gestação, provocou desenvolvimento retardado nos fetos (ALMEIDA e LEMONICA, 2000). Em outro estudo, a toxicidade de *Hyptis martiusii* Benth (Cidreira-Brava) (Lamiaceae), quando administrado de forma oral em ratas prenhas causou efeitos tóxicos nas fases de pré-implantação e organogênese (CALDAS et al., 2020).

A avaliação dos batimentos cardíacos em vertebrados submetidos aos tratamentos é um indicador da regulação do Sistema Nervoso Autônomo, o qual quando desequilibrado por longos períodos tem sido associado a uma variedade de distúrbios somáticos e mentais (LÉONARD et al., 2019). Desta forma, fatores que causam alterações nos batimentos cardíacos podem causar inúmeros problemas ao embrião. No presente trabalho, a FHFSRc 2% reduziu os batimentos cardíacos dos embriões de *G. gallus domesticus*. A redução nos batimentos cardíacos também foi observada por Cruz et al. (2021) quando embriões de *G. gallus domesticus* foram expostos a *G. lucidum*.

A análise do desenvolvimento embrionário através dos estágios embrionários possibilita verificar se a exposição a diferentes substâncias pode alterar o padrão de crescimento embrionário, em relação ao padrão de organização corporal normal, das estruturas embrionárias (KMECICK, 2018). Os embriões expostos a FHFSRc não apresentaram alterações nos estágios do desenvolvimento quando comparados a embriões expostos aos tratamentos controle, considerando assim, que FHFSRc não altera a organização corporal normal, assim como observado quando os embriões de *G. gallus domesticus* foram expostos ao extrato vegetal de *C. winterianus* (GALVÃO et al., 2019). Verificou-se que outros agentes têm se mostrado tóxicos aos embriões de *G. gallus domesticus*, alterando a estrutura embrionária, como verificado quando estes foram expostos a *G. lucidum* (CRUZ et al. 2021).

Os agentes teratogênicos são capazes de causar malformações fetais (DICKE, 1989). Quando se fala de *G. gallus domesticus*, um exemplo claro desses agentes é *B. bassiana* que causou 66,7% de malformações em embriões vivos, apresentando desde encurtamento do corpo e cauda até falhas no fechamento do tubo neural da região encefálica, enquanto que óleo, essencial de *Pogostemon cablin* Benth (Lamiales: lamiaceae) (Patchouli) causou 25% de malformações a embriões vivos, sendo atrofia caudal, dilatação do canal lacrimal, raquisquise, gastrosquise entre outros (LARENTIS et al., 2017). O extrato vegetal de *C. winterianus* (GALVÃO et al., 2019) e o extrato de *G. lucidum* (CRUZ et al., 2021) também causaram malformações a embriões de *G. gallus domesticus*.

Pode-se considerar que a FHFSRc (1%, 1,5% e 2%) também é um agente teratogênico, uma vez que causou probabilidade de malformação entre 25 e 50% quando injetado na câmara de ar do ovo. Entretanto, quando pulverizados externamente, essa ocorrência de malformação ficou entre 12,5% e 25%. É importante ainda salientar que a ocorrência de malformações é inerente ao desenvolvimento embrionário de qualquer espécie (CARLSON, 1996).

Quando a FHFSRc é pulverizada externamente, a casca do ovo age como uma barreira, protegendo o embrião de *G. gallus domesticus*. A casca dos ovos é formada no istmo, secção onde as membranas, interna e externa, dos ovos são formadas. A membrana interna estabelece-se primeiro, seguida pela membrana externa, que é três vezes mais grossa que a membrana interna. Essa quando completa, é composta quase inteiramente de carbonato de cálcio (CaCO_3), com pequenas quantidades de sódio, potássio e magnésio. As duas membranas são mantidas juntas até que o ovo seja posto, momento em que na extremidade do ovo, as duas membranas se separam para formar a célula de ar, essencial para a respiração do embrião (FIGUEIREDO et al., 2021).

Esta estrutura tem como função principal a proteção do conteúdo interno do ovo contra injúrias mecânicas e invasão de agentes teratogênicos. Além disso, controla a troca de gases e a evaporação de água através dos poros da casca, bem como o fornecimento de cálcio para o desenvolvimento embrionário (SESTI, 2003; MAZZUCO, 2008; FIGUEIREDO et al., 2021). Isso justifica a menor porcentagem de malformações quando a FHFSRc foi pulverizada externamente ao ovo. Assim, pode-se pressupor que a FHFSRc quando usada a campo pode ser menos danosa a

vertebrados ovíparos, uma vez que estes possuem uma barreira de proteção natural a agentes contaminantes.

As malformações de *G. gallus domesticus* foram malformações relacionadas a região cefálica, do tronco e caudal e fechamento do tubo neural. As malformações na região cefálica encontradas foram falha nas subdivisões das vesículas encefálicas e falha no fechamento do tubo neural (raquisquise). Já nas demais regiões foram encontradas malformações como atrofia caudal e, na região abdominal, gastrosquise, além dessas, muitos embriões apresentavam malformações gerais. As malformações encontradas são consideradas graves, pois, possivelmente levariam o embrião a óbito. Em humanos a principal causa de mortalidade infantil são as malformações congênitas (MOORE E PERSAUD, 2008). As malformações congênitas exibidas ao nascimento ou após a ele em sua maioria se originam até a oitava semana de gestação (SADLER, 2016; HILL, 2017). Sabendo que os embriões de aves de três a cinco dias se assemelham morfológicamente, bem como, possuem estruturas análogas a embriões humanos de três a cinco semanas de desenvolvimento, pode-se associar as malformações encontradas neste trabalho a malformações desenvolvidas entre a terceira e quinta semana de desenvolvimento embrionário humano (GONZALES, 1994).

Os estudos referentes à toxicidade de agentes teratogênicos ao desenvolvimento embrionário de vertebrados vem crescendo nas últimas décadas, isso é justificado devido ao uso de agrotóxicos nos agroecossistemas, o que pode estar atrelado a malformações embrionárias ou até a morte desses organismos não alvo. Desta forma, se faz necessária a realização de investigações que esclareçam os riscos que estes agentes podem ocasionar a organismos não-alvos.

Percebe-se a importância de ampliar o número de testes para verificar de forma quais são os efeitos causados pela FHFSRc a *G. gallus domesticus*, uma vez que, este é um modelo biológico adequado, pelo qual, pode-se aferir os danos causados por inseticidas botânicos a vertebrados. Dentre futuros testes, recomendam-se análises das possíveis alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares ocasionados a estes. Vale ressaltar a importância de realizar testes com a FHFSRc em outros vertebrados, comparando os resultados obtidos no presente trabalho, bem como, em futuros trabalhos utilizando embriões de *G. gallus domesticus* como modelo biológico. Em novos testes, recomenda-se utilizar inseticidas químicos sintéticos e/ou

inseticidas botânicos comerciais, como controle positivo, comparando o grau de toxicidade previamente definido de um inseticida ao grau de toxicidade da FHFSRc.

Há que se destacar a dificuldade de realização de testes com vertebrados, o que torna o embrião de *G. gallus domesticus* uma das alternativas mais indicadas para este fim, levando em consideração o ciclo de vida deste modelo biológico. Para tanto, faz-se necessária a padronização de novas metodologias de exposição destes embriões a agentes contaminantes, como a metodologia de pulverização empregada no presente trabalho, a qual é diferente da forma de exposição através da injeção na câmara de ar, usualmente utilizada em trabalhos com este modelo biológico (LARENTIS et al., 2017; GALVÃO et al., 2019; CRUZ et al. 2021). Este trabalho também contribui para a inclusão de uma nova metodologia para testes de inseticidas botânicos sobre *G. gallus domesticus*.

Para evitar que ovos de vertebrados, como *G. gallus domesticus* sejam afetadas pela FHFSRc a campo, algumas estratégias de aplicação devem ser tomadas. Para melhor definir essas estratégias, deve-se levar em consideração o comportamento destes animais nos agroecossistemas, buscando aplicar este produto longe de matas nativas, reservas legais e demais áreas de proteção vegetal. Bem como, avaliando com cuidado os ambientes nos quais estes produtos serão aplicados, a fim de preservar os organismos não-alvo presentes nestes agroecossistemas. Ainda, levando em consideração a toxicidade da FHFSRc a embriões de *G. gallus domesticus*, recomenda-se o uso de EPIs adequados para a aplicação de produtos, a fim de garantir a segurança do aplicador a campo.

4.6 Conclusão

A fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* é tóxica a embriões de *G. gallus domesticus* reduzindo a sobrevivência destes tanto quando injetada na câmara de ar, quanto, quando pulverizada sobre a casca dos ovos. A fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis* causa malformações corporais em embriões de *G. gallus domesticus* quando injetada na câmara de ar do ovo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição dos organismos não-alvo fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*, independentemente da concentração ou forma de exposição utilizada, causou redução na probabilidade de sobrevivência tanto de *A. mellifera* quanto de *G. gallus domesticus*.

Este inseticida botânico se mostrou capaz de alterar significativamente o deslocamento vertical de *A. mellifera*, bem como, causou sérias alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus*.

Faz-se necessário a aplicação de outros testes nestes organismos não-alvo (modelos biológicos), bem como, em organismos não-alvo ainda não expostos a este inseticida botânico. Assim, com base em análises futuras torna-se possível delimitar os níveis de toxicidade causado pela fração hexânica de frutos e sementes de *R. communis*, e assim delimitar a indicação de uso deste inseticida botânico.

REFERÊNCIAS

- ABATI, R. et al. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 25, p. 32282–32298, 2021.
- ADOUANE, S. et al. Rosemary essential oil potential as a bio-insecticide for protecting stored dates against the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection**, v. 11, n. 2, 2022.
- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, nov. 2012.
- AGROLINK. **O Brasil é o maior consumidor se agrotóxicos do mundo?**. Mar, 2023. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/o-brasil-e-o-maior-consumidor-se-agrotoxicos-do-mundo-_477082.html. Acesso em: 20/03/2023.
- AHMAD, F. et al. Bioactivity of medicinal plant extracts from *Peganum harmala* and *Cichorium intybus* against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 769–776, 6 jan. 2023.
- ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. DA (ED.). **Agricultura tropical quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- ALEXANDER, J.; ANDERSSON, H. C.; BERNHOFT, A.; BRIMER, L.; COTTRILL, B.; FINK-GREMMELS, J.; JAROSZEWSKI, J.; SOERENSEN, H. Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **European Food Safety Authority**, v. 726, p. 1- 38, 2008.
- ALI, A. M.; IBRAHIM, A. M. A. Castor and camphor essential oils alter hemocyte populations and induce biochemical changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 2, p. 631–637, jun. 2018.
- ALLEIN, C. M. et al. **Seletividade do extrato hexânico de frutos de *Ricinus communis* L.(Euphorbiaceae) à *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1–2, p. 53–60, nov. 2000.
- ALMEIDA, F. DE A. C. et al. Efeitos de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 585–590, dez. 2005.

ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R. & NADAE, J. de. **Risco tóxico e potencial perigo ambiental no ciclo de vida da produção de milho** *Espacios*, v.38, nº.1, 2017, p.12.

AMORIM, V. A.; BORGES, L. P. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

API, E. AGROTÓXICOS E SUA PROBLEMÁTICA NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. **Revista Científica Multidisciplinar O Saber-ISSN 2675-9128**, v. 1, n. 7, 2021.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 838–844, jul. 2011.

ASSIS, E. M. et al. Toxicity of castor bean (*Ricinus communis*) pollen to honeybees. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 141, n. 1-2, p. 221-223, 2011.

BALDIN, E. L. et al. Controle de mosca-branca com extratos vegetais, em tomateiro cultivado em casa-de-vegetação. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 602–606, dez. 2007.

BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. **Revista Campo-Território**, v. 1, n. 2 Ago., p. 123–151, 30 ago. 2006.

BARBOSA, F. S., KAWANO, T. Embrilogia. **Tópicos em malacologia médica [online] - SciELO Books**, p. 314. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995.

BATTISTI, L. et al. Review on the sublethal effects of pure and formulated glyphosate on bees: Emphasis on social bees. **Journal of Applied Entomology**, v. 147, n. 1, p. 1–18, 21 fev. 2023.

BAUNGRATZ, A. R. et al. Toxicity assessment of marjoram and pomegranate aqueous extracts for Cobb chicken, non-target organisms of pest control. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 3331–3335, 2020.

BELSKY, J.; BIDDINGER, D. J.; JOSHI, N. K. Whole-Body Acute Contact Toxicity of Formulated Insecticide Mixtures to Blue Orchard Bees (*Osmia lignaria*). **Toxics** v. 9, n. 3, p. 61, 17 mar. 2021

BESTETE, L. R. et al. Toxicidade de óleo de mamona a *Helicoverpa zea* e a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 791–797, ago. 2011.

BIANCHI, M. V. et al. Intoxicação espontânea por *Ricinus communis* em ovinos. **Acta scientiae veterinariae. Porto Alegre, RS. Vol. 46, supl. 1 (2018), Pub. 294, 4 p.**, 2018.

BLIBECH, I.; KSANTINI, M.; SHETE, M. Insecticidal Activity of an Indian Botanical Insecticide ULTRA ACT® against the Olive Pest *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) in Tunisia. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 10, n. 01, p. 69–80, 2020.

BOJARSKI, B; WITESKA, M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19236-19250, 2020.

BORGES, M.E.; Uso do Embrião de Ave (*Gallusgallus*) 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.**

BRAGA, S.; SILVA, M. E.; RAGA, A. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: tephritidae). **Biológico, São Paulo**, v. 81, n. 1, p. 1-30, 2019.

BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. 6ª ed. Curitiba UFPR, 2017.

CALDAS, G. F. R. et al. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLOGIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *HYPTIS MARTIUSII* BENTH. (CIDREIRA-BRAVA) E DE SEU COMPOSTO MAJORITÁRIO 1,8-CINEOL: UMA REVISÃO. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 461–471, 1 abr. 2020.

CALDERONE, N. W. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37235, 2012.

CAMPANHOLA, C; BETTIOL, Wagner. **Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil**. 2003.

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

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 176–192, 31 mar. 2011.

CASTRO OLIVEIRA, J. A. et al. *Eugenia uniflora*, *Melaleuca armillaris*, and *Schinus molle* essential oils to manage larvae of the filarial vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 23, p. 34749–34758, 2022.

CAZAL, C. M.; BATALHÃO, J. R.; DOMINGUES, V. C.; BUENO, O. C.; RODRIGUES FILHO, E.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Highspeed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. **Journal Of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4290-4294, 2009.

CELLI, G.; MACCAGNANI, B. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 137–139, 2003.

CHAABAN, A. et al. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 24, p. 2954–2958, 17 dez. 2018.

CHEGINI, S. G. et al. Toxicity of Shirazi thyme, *Zataria multiflora* essential oil to the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 38, n. 4, p. 340–347, 2018.

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

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas tóxicas para abelhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 547-551, 2022.

CLEMENTS, J. et al. Conjugated linoleic acid as a novel insecticide targeting the agricultural pest *Leptinotarsa decemlineata*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0220830, 14 nov. 2019.

CONAB. **acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.10, safra 2022/23, n 3, dezembro 2022.

CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Brasil: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC)**, 2013.

CORNÉLIO, R. et al. **Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas**. 2010.

COSME, L. V.; CARVALHO, G. A.; MOURA, A. P. Efeitos de inseticidas botânico e sintéticos sobre ovos e larvas de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 251-258, 2022.

COSTA DANTAS, P. et al. **Brazilian Journal of Development**. Toxicidade de extratos vegetais em *coccidophilus citricola* (brèthes, 1905) (coleoptera: coccinellidae) Toxicity of vegetable extracts in *coccidophilus citricola* (brèthes, 1905) (coleoptera: coccinellidae). n. 3, p. 2060–2067, 2019.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos. **FUNEP: Jaboticabal**2006.

CRUZ, M. P. DA et al. Action of *Ganoderma lucidum* mycelial growth filtrates on *Erysiphe diffusa* and embryotoxicity assessment in a chicken embryo model. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 65, n. 1, p. 47–57, 21 ago. 2021.

CUNHA PEREIRA, R. et al. Toxicity of botanical extracts and their main constituents on the bees *Partamona helleri* and *Apis mellifera*. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 3, p. 246–257, 13 abr. 2020.

CUNHA, M. A. S. et al. Análise molecular da variabilidade genética entre genótipos de R CUTLER, G. C.; GUEDES, R. N. C. Occurrence and Significance of Insecticide-Induced

Hormesis in Insects. *Acs Symposium Series*, [S.L.], p. 101-119, jan. 2017.
icinus communis L. revelada por marcadores RAPD. 2006.

DIBARTOLOMEIS, M. et al. An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. **PLoS one**, v. 14, n. 8, p. e0220029, 2019.

DICKE, J. M. Teratology: Principles and Practice. **Medical Clinics of North America**, v. 73, n. 3, p. 567–582, maio 1989.

FIGUEIREDO, E. M; PINTO, Rogério. **Fisiologia da formação do ovo: um referencial teórico**. 2021.

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

GAHUKAR, R. T. A review of castor-derived products used in crop and seed protection. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 5, p. 655–666, 7 nov. 2017.

GAIOLA, L.; CARDOSO, C. A. L. EUGENIA UNIFLORA L. - UMA ESPÉCIE POPULAR BRASILEIRA COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. Em: **Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros**. Editora Científica Digital, 2022. p. 83–98.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GALVÃO, G. C. et al. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATO VEGETAL DE *Cymbopogon winterianus* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE AVE. Em: **Impactos das tecnologias nas ciências biológicas e da saúde 3**. Antonella Carvalho de Oliveira, 2019. p. 144–149.

GARCÍA, A. Á; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011. SINGH, Ashutosh et al. Insecticidal Activity, Toxicity, Resistance and Metabolism of Pyrethroids: a Review. **Science and Technology Indonesia**, v. 7, n. 2, p. 238-250, 2022

GARIBALDI, L. A. et al. Time to Integrate Pollinator Science into Soybean Production. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 36, n. 7, p. 573–575, jul. 2021.

GIANNINI, T. C. et al. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849–857, 1 jun. 2015.

GILBERT, S. F. Developmental Biology. **Massachusetts: Sinauer, 2000**; p. 749. 2001.

GILBERT, S. F.; BARRESI, Michael JF. Biologia do desenvolvimento. Artmed Editora, 2019.

GONÇALVES DINIZ, A. et al. Bio-insecticide effect of isolates of *Fusarium caatingaense* (Sordariomycetes: Hypocreales) combined to botanical extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 384–395, 2 abr. 2020.

GONÇALVES, L. S. e JONG, D. Desenvolvimento da apicultura com abelhas africanizadas no Brasil e sua expansão no Nordeste. 2005, **Anais. São Paulo: SBPC**, 2005. . Acesso em: 15 AGO. 2022.

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

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 27 mar. 2015.

GOULSON, D. et al. Choosing rewarding flowers; perceptual limitations and innate preferences influence decision making in bumblebees and honeybees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, p. 1523-1529, 2007.

GROBLER, J. E. H. **The effect of Ricinus communis on larval behaviour and midgut microbe communities of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera : Noctuidae)**. 2019.

GULLAN, P. G.; CRANSTON, P. S. **Os Insetos: Um Resumo de Entomologia**. 4ª ed. São Paulo: Roca, 2012.

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

HARMATHA, J.; NAWROT, J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related 61 Phenylpropanoids with a Methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 51-60, 2002.

HILL, M. A. **Embryology Carnegie Stage Comparison**. Disponível em: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison. Acesso em: 20 de novembro, 2022.

HUNG, K.-L. J. et al. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 20172140, 10 jan. 2018.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 248, 2011.

ISMAIL, M.; COMPTON, S. G.; BROOKS, M. Interaction between temperature and water nutrient levels on the fitness of *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae), a biological control agent of water hyacinth. **Biological Control**, v. 106, p. 83–88, mar. 2017.

ISMAN, M. B. BOTANICAL INSECTICIDES, DETERRENTS, AND REPELLENTS IN MODERN AGRICULTURE AND AN INCREASINGLY REGULATED WORLD. **Annual Review of Entomology**, v. 51, n. 1, p. 45–66, 1 jan. 2006.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise?. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 233-249, 2020.

JUNIOR, E. M. DE A. et al. Toxicity of castor bean (*Ricinus communis*) pollen to honeybees. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 141, n. 1–2, p. 221–223, abr. 2011.

JUSTINIANO, W.; PEREIRA, M. F. A.; AMORIM, L. C. S.; MACIEL, C. D. G. Eficiência do óleo de Neem no Controle do Ácaro da Leprose dos Citros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 1, p. 38-42, jan./mar. 2009.

KAUR, G.; SINGH, R.; SINGH, A. Impact of Neem Oil on Developmental Stages of Honey Bee *Apis mellifera* L. **Indian Journal of Entomology**, p. 1-5, 2022.

KAUR, M. et al. Biological effects of secondary metabolites of *Inula racemosa* on the parasitoid *Bracon hebetor*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 169, n. 8, p. 743–749, 27 ago. 2021.

KIDANU, S.; AZEREFEGNE, F.; MENDESIL, E. Natural insecticides for the control of urticating ant, *Tetramorium aculeatum* Mayr (Hymenoptera: Formicidae) in a coffee plantation of Southwestern Ethiopia. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06546, mar. 2021.

KMECICK, M. Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*). **Universidade Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**. Curitiba, 2017.

KORN, M.; S. CRAMER, K. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, 1 out. 2007.

LARENTIS, L. T. et al. Avaliação dos efeitos de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) e óleos essenciais de *Pogostemon cablin* (Lamiales: Lamiaceae) sobre o desenvolvimento embrionário inicial de *Gallus gallus* (Galliformes: Phasianidae). **IV Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR-DV, I Mostra Científica da Pós-Graduação da UTFPR-DV**. Dois Vizinhos - PR, 2017.

LÉONARD, A.; CLÉMENT, S.; KUO, C.D.; MANTO, M. Changes in Heart Rate Variability During Heartfulness Meditation: A Power Spectral Analysis Including the Residual Spectrum. **Front. Cardiovasc. Med.** v.6, p.1-8, 2019.

LIBARDONI, G. **Seletividade de agentes de controle de pragas a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. 2021. 88 folhas Tese (Programa de Pós Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

LIMA JÚNIOR, A.F. Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Anthroscelides obtectus* e *Sitophilus* sp. 2011. 67 f. **Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.**

LIYUN, R. et al. Evaluation of ten botanical insecticides against the sweet potato Weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius, 1798) (Coleoptera: Brentidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 11, p. 1531–1539, 30 nov. 2020.

MAHMOOD, I. et al. Effects of Pesticides on Environment. Em: **Plant, Soil and Microbes**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 253–269.

MAIS SOJA. **O Brasil é o maior consumidor mundial de defensivos agrícolas?** Dez, 2021. Disponível em: <https://maissoja.com.br/o-brasil-e-o-maior-consumidor-mundial-de-defensivos-agricolas/>. Acesso em: 20/03/2023.

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

MARCELINO, A. F.; WACHTEL, C. C.; GHISI, N. d. C. Are our farm workers in danger? Genetic damage in farmers exposed to pesticides. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 3, p. 358, 2019.

MARQUES, M. A. COMPATIBILIDADE E ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA A *Beauveria bassiana* NO CONTROLE DE *Bemisia tabaci* BIÓTIPO B E SELETIVIDADE A *Trichogramma pretiosum*. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, 2015.

MARTINEZ, E. A. et al. Oferta de serviços ambientais a partir de diferentes agroecossistemas de base familiar no sul do Rio Grande do Sul. **Agricultura Familiar: Pesquisa, Formação e Desenvolvimento**, v. 11, n. 1, p. 71-86, 2017.

MARTINHO, C. et al. Apicultura: revisão de literatura. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-17, 2022.

MARTYNOV, V. O. et al. Influence of essential oils of plants on the migration activity of *Tribolium confusum* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Biosystems Diversity**, v. 27, n. 2, p. 177–185, 2019.

MAZZUCO, H. Ovo: alimento funcional, perfeito à saúde. **Avicultura Industrial**, n. 2, p. 12-16, 2008.

MENEZES, E. L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiologia**, 2005.

MILDEMBERG, R. A. R.; O, P. G.; RIBAS, J. L. C. Teratogenia e Agrotóxico. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 9, p. 109-122, 2017.

MIRANDA, A. R. Breve História da Agropecuária Brasileira. **Embrapa Milho e Sorgo**. Capítulo em livro científico 2020.

MOAWAD, S. S.; EBADAH, I. M. A. **Assessment of some botanical oils impact on biology of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2021.

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

MONTANARI, T. Embriologia: texto, **atlas e roteiro de aulas práticas**. 2013.

MORALES, M. M. MÉTODOS ALTERNATIVOS À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA CIENTÍFICA: MITO OU REALIDADE?. **Ciência e Cultura**, v. 60, p. 33–36, fev. 2008.

MOREIRA, M. D. et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. **Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM**, p. 89-120, 2006.

NEVES, R. T. et al. EFEITO LARVICIDA DE RICINUS COMMUNIS L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, 7 abr. 2014.

NOCELLI, R. C., et al. "Riscos de pesticidas sobre as abelhas." **Semana dos Polinizadores**. V. 3. 2012.

OKY, A. S.; PURNOMO, C. W.; MULYONO, P. The Effect of Botanical Pesticide Extract Addition on the Nutrient Release of Fertilizer from Poultry Manure. **Key Engineering Materials**, v. 789, p. 82–86, nov. 2018.. p. 82-86.

OLIVEIRA, D. H. R. de. **O extrato hexânico de frutos e sementes de Ricinus communis é seletivo a Telenomus podisi (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Platygasteridae)?**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

OLIVEIRA, L. S. DE. **O USO DE AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA CONVENCIONAL E SEUS RISCOS NOS SERES VIVOS**. Anais do I Congresso Nacional de Ciências Agrárias On-line. **Anais.Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, 29 jul. 2021.

OLIVEIRA, M. O. Declínio populacional das abelhas polinizadoras de culturas agrícolas. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 01–06, 14 dez. 2015.

OVIEDO, A. et al. Biopesticide effects on pupae and adult mortality of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Austral Entomology**, v. 57, n. 4, p. 457–464, nov. 2018.

PACHECO BORGES, L.; AMORIM, V. A. **METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS SECONDARY PLANT METABOLITES**Revista Agrotecnologia, Ipameri. 2020.

PAPA, G. et al. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 233, 2022.

PARANÁ. Secretaria da informação. **Agricultura e abastecimento**. [Curitiba]: SI, [2022]. Disponível em: <https://www.aen.pr.gov.br/Noticia/Parana-se-mantem-na-lideranca-nacional-da-producao-de-mel-aponta-boletim#:~:text=O%20Paran%C3%A1%20se%20manteve%20como,2%25%20de%20toda%20produ%C3%A7%C3%A3o%20nacional..> Acesso em: 18 Nov. 2022.

PARRA, J.R.P. et al. Biological Control in Brazil: An overview. **Sci. Agric.** v.71, n.5, p.345-355, 2014.

PARRA, J.R.P. et al. **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002. 626p.

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. Produção de mel. Sistema de Produção. **EMBRAPA Meio Norte**, julho, 2003.

PÉRES, V. F. et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1–2, p. 115–118, fev. 2006.

PESSETTI, M. Modernização da agricultura e seus desdobramentos no espaço agrário. **Geografia em Atos** (Online), v. 5, p. 1-26, 2021.

PESSOA, A. DA S. et al. *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae) sob ação de extratos vegetais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 329–334, dez. 2014.

PETROSKI, R.J.; STANLEY, D.W. Natural compounds for pest and weed control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 57, n.18, p. 8171-8179, 2009.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 1 out. 2017.

PINHEIRO, I. et al. Effects of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) essential oils on the honey bees *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera) foraging. **Revista de Ciencias Agrícolas**, v. 36, n. SPE, p. 31-41, 2019.

PINTO, Â. C. et al.. **Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas**. Química Nova, São Paulo, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

PINTO, B. G. da S. **Análise da toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) sobre o desenvolvimento inicial de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus* L. 1758)**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

POSTELARO, E. R; DE AQUINO, M. D. H; JUNIOR, E. F. APICULTURA FAMILIAR: sua importância no cenário econômico, social e ecológico. **Revista Interface Tecnológica**, v. 18, n. 1, p. 298-307, 2021.

QUIGLEY, T. P.; AMDAM, G. V; HARWOOD, G. H. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. **Current Opinion in Insect Science**, v. 35, p. 132–137, out. 2019.

RAMOS-LÓPEZ. Activity of the main fatty acid components of the hexane leaf extract of *Ricinus communis* against *Spodoptera frugiperda*. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, v. 11, n. 18, 1 mar. 2012.

R CORE TEAM (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. acesso em: 22/02/2023.

REES, N. E.; SPENCER, N. R. Biological control of leafy spurge. In: **Noxious range weeds**. CRC Press, 2021. p. 182-192. RIBAS, P. P; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**,

RIBEIRO, N. A. A.; BARBARA, G.; FERRO, D. M. A. AS DIFICULDADES DA POLINIZAÇÃO NA AGRICULTURA ATRAVÉS DA ESPECIE DE ABELHA

EUROPEIA APIS MELLIFERA. **ANAIS DO FÓRUM DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO UNIFUNEC**, v. 8, n. 8, 2017.

RIOBA, N. B.; STEVENSON, P. C. Opportunities and scope for botanical extracts and products for the management of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) for smallholders in Africa. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 207, 2020.

RÓDIO, G. R.; ROSSET, I. G.; BRANDALIZE, A. P. C. Exposição a agrotóxicos e suas consequências para a saúde humana. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e43010817526, 15 jul. 2021.

RONDELLI, V. Desempenho do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e do óleo de mamona para o controle de *Plutella xylostella*(L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.**

RONNSEN, M. E. **Extração de alcaloides de semente de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

RUTKOSKI, C. F. **Toxicidade de três inseticidas em um vertebrado não-alvo, usando como modelo *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2019.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAITO, M. L. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Rev. Ecotox. Meio Ambiente**, v.14. 2004.

SALEM, N. et al. Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. **International journal of food properties**, v. 20, n. sup3, p. S2899-S2913, 2017.

SALOMÉ, J. R. Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebrapedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico [dissertação]. **Brasil: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz**, 2007.

SANTANA, E. C. et al. Substâncias fitoquímicas para o controle do *Aedes aegypti*: protocolo de scoping review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e39411629343, 1 maio 2022.

SANTIAGO, G. P. et al. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 792-796, 2008. SANTO, J. M. B. D. E. et al. Populações de insetos-praga: diversidade e similaridade em cultura agrícola. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 1, p. 0203–0217, 2022.

SANTOS, L. DOS et al. Effect of anonaceous extracts on *Aphis gossypii*; (Glover, 1887) (Hemiptera: Aphididae) and selectivity to *Eriopsis connexa*; (Germar, 1824)

(Coleoptera: Coccinellidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, n. 1, p. 36267, 15 maio 2018.

SANTOS, P. L. Dos. et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 53, n. 17, p. 2562-76, 2013.

SANTOS, PODEROSO, SILVA-MANN, ANDRADE, ALVES, RIBEIRO, CARVALHO, VIABILIDADE DE OVOS DE *Podisus nigrispinus* DALLAS (HETEROPTERA: ASOPINAE) EXPOSTOS A EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTES DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) e PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.), **III Congresso Brasileiro de Mamona**. 2008.

SCHOENWOLF, G. C. The Avian Embryo. Em: **Cell Lineage and Fate Determination**. [s.l.] Elsevier, 1999. p. 429–436.

SESTI, L.A.C. Órgãos reprodutivos e reprodução de aves domésticas. In: MACARI, M., GONZALES, E. (ed.) **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA, 2003. p.3-33.

SILVA, N.R. Aspectos do perfil e do conhecimento de apicultores sobre manejo e sanidade da abelha africanizada em regiões de apicultura de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). **Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis – SC. 115 p. 2004.

SIVITER, H. et al. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. **Nature**, v. 596, n. 7872, p. 389-392, 2021.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Completing the method: validation and transfer. **Practical HPLC method development**, v. 2, p. 705-705, 1997.

SOARES, C.; SANTOS, D. **REVISTA VERDE DE AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL GRUPO VERDE DE AGRICULTURA ALTERNATIVA (GVAA) APICULTURA UMA ALTERNATIVA NA BUSCA DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL APICULTURE AN ALTERNATIVE IN SEARCH OF SUSTAINABLE DEVELOPMENT**. 2009.

SOMBRA, K. E. S. et al. Selectivity of essential oils to the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Ciencia Agronomica**, v. 53, 2022.

SOTELO-LEYVA, C. et al. Insecticidal Compounds in *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) to Control *Melanaphis sacchari* Zehntner (Hemiptera: Aphididae). **Florida Entomologist**, v. 103, n. 1, p. 91, 8 abr. 2020.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA JURÍDICA DA FACULDADE MARECHAL RONDON, 4., 2006, São Manuel, SP. Artigos publicados... São Manuel, SP: FMR, 2006. p. 1-9. Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel, p. 1-9, maio 2006.

SPLETOZER, A. G. et al. Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 974-997, 2021.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 1, p. 49–54, mar. 2011.

TELLES, D. M. et al. Natural Products can Efficiently Control the Greater Wax Moth (Lepidoptera: Pyralidae), but are Harmless to Honey Bees. **Sociobiology**, v. 67, n. 1, p. 89, 18 abr. 2020.

THACKER, J. R. M. (JONATHAN R. M. **An introduction to arthropod pest control**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

TOLOU, N. et al. Toxicity and Repellency Effects of, *Achillea Millefolium* and *Lavandula Angustifolia* and *Mentha Piperita* Plants Extracts on *Bracon Hebetor* Adult Insect. **Journal of Animal Biology**, v. 14, n. 3, p. 61–70, 2022.

TOMÉ et al., Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, 124, p. 103–109, 2015.

VAN DER WERF, H. M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 60, n. 2–3, p. 81–96, dez. 1996.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.390-400, 2003.

VIGAD, N. et al. Physical characteristics, chemical compositions, and insecticidal activity of plant essential oils against chicken lice (*Menopon gallinae*) and mites (*Ornithonyssus bursa*). **Veterinary Integrative Sciences**, v. 19, n. 3, p. 449–466, 6 maio 2021.

VIEIRA, C. de F. **Toxicidade aguda em eleuteroembriões do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos ao extrato hexânico de *Ricinus communis***. 2020. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. 2010.

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. **ArchivesofToxicology**, 60: 454-459, 1987.

WARMLING et al. Efeito tóxico e subletal do extrato hidroalcoólico e frações purificadas de *Ricinus communis* sobre *Chrysodeixis includens* Wal. **Efeito tóxico e subletal do extrato hidroalcoólico e frações purificadas de *Ricinus communis* sobre *Chrysodeixis includens* Wal**, p. 474–475, 2019.

WIESBROOK. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides. . **Illinois Pesticide Review**, p. 1–3, 2004.

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

XAVIER, V. M. et al. Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honey bees. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 137, 2015.

YADAV, A. .; SINGH, V. .; YADAV, A. . Efficacy of Different Insecticides/Botanicals against Pea Stemfly, *Ophiomyia phaseoli* Tryon. **LEGUME RESEARCH - AN INTERNATIONAL JOURNAL**, n. of, 5 mar. 2020.

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

YEBOAH, A.; YING, S.; LU, J.; XIE, Y.; AMOANIMAA-DEDE, H.; BOATENG K. G. A.; CHEN, M.; YIN, X. Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties Akwasi. **Food Science and Technology**, Campinas, 2020

YOGAPRIYA, A.; USHARANI, B.; SURESH, K. Impact of Insecticides and Bioagents on Indian Bee *Apis Cerana Indica* F. **Indian Journal of Entomology**, v. 83, n. 4, p. 598–601, 2021.

ZHANG, G.; HE, L.; HU, M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 18–25, jan. 2011.