

UNIVERSIDADE TÉCNOLOGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÉSSICA COUSSEAU PILONETTO

**TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAS DE PATCHOULI (*Pogostemon
cablin* Benth.) E PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) A EMBRIÃO DE
AVE (*Gallus gallus domesticus* L.)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2019

JÉSSICA COUSSEAU PILONETTO

TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.) E PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) A EMBRIÃO DE AVE (*Gallus gallus domesticus*, L.)

Trabalho de Conclusão de Curso Superior em Ciências Biológicas/Licenciatura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso I.

Orientadora: Professora Patrícia Franchi de Freitas.
Coorientadora: Professora Lilian de Souza Vismara.

DOIS VIZINHOS

2019



TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso n° ___

Toxicidade de óleos essenciais de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) a embrião de ave (*Gallus gallus domesticus* L.)

por

Jéssica Cousseau Pilonetto

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 15 horas e 00 minutos do dia 05 de dezembro de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Michele Potrich
UTFPR – Dois Vizinhos

Profa. Patrícia Franchi de Freitas
Orientadora
UTFPR – Dois Vizinhos

Prof. Elton Celton de Oliveira
UTFPR - Dois Vizinhos

Profa. Marciele Felippi
Coordenadora do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – Dois Vizinhos

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter permitido com que chegasse até aqui, foram tantos os desafios encontrados pelo caminho mas enfim, com toda sua graça mais um sonho foi possível.

Agradeço ao meu esposo Jean Pilonetto e também minha filha Gabrielly Cousseau Pilonetto por estarem sempre ao meu lado, suportando minha ausência durante este período e dando forças para que tudo isso fosse possível. Sem vocês não teria chegado até aqui.

A toda minha família que me apoiou e incentivou durante este tempo.

A Professora Patrícia Franchi de Freitas por aceitar o desafio de me orientar durante o desenvolvimento deste trabalho. E Também a Professora Lilian de Souza Vismara pela coorientação e auxílio durante o processo de experimentação.

Meus sinceros agradecimentos a todos os colegas da graduação que em cada período tiveram sua parcela de contribuição.

Em especial agradeço as minhas amigas e colegas de classe Thainá Marcella Cordeiro, Vanessa Aparecida Ribeiro Alberti, Fabiane Jacinto que desde o primeiro período da graduação estiveram comigo apoiando e incentivando, dando aquele empurrãozinho quando necessário. Logo no Terceiro período conhecemos a Claudia Cristina Rossoni que chegou para completar nosso time e que fez parte do processo de desenvolvimento experimental deste trabalho juntamente com a Silvane Zancanaro de Oliveira. As amizades conquistadas neste período são inesquecíveis, foram quatro anos de convivência e companheirismo que merecem ser agradecidos.

A UTFPR, câmpus Dois Vizinhos por abrir as portas para alunos de todas as regiões, por dispor de um corpo docente de primeira.

Muito obrigada a todos!

“Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos
põe pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos,
acrescentando a ele algo que fazemos.”
(Paulo Freire)

RESUMO

PILONETTO, Jéssica Cousseau. **TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.) E PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) A EMBRIÃO DE AVE (*Gallus gallus domesticus* L.)**. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

O processo de modernização da agricultura vem ocorrendo desde a década de 60 como forma de atender a demanda populacional. Esse processo também faz com que ocorra um grande aumento no uso de produtos fitossanitários. Pensando neste fator e principalmente na saúde humana e no meio ambiente, se faz necessária a busca por métodos alternativos no controle de fitopatologias inerentes à produção vegetal. O manejo visando o controle de doenças fúngicas pelo uso de extratos vegetais é uma alternativa que está sendo muito estudada no cenário da Produção Vegetal. Entre os extratos vegetais, sabe-se que o uso de óleos essenciais (OEs) pode controlar o crescimento micelial fúngico, evitando sua proliferação tanto na pré quanto na pós colheita. Desta forma os OEs de patchouli e pitangueira agem no controle de *Botrytis cinerea*, agente causador do mofo cinzento em diversas culturas agrícolas. O presente trabalho objetivou avaliar, via bioensaio in ovo a embriotoxicologia da concentração efetiva dos OEs de patchouli ($1877,16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e pitangueira ($970,66 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e também um fungicida sintético a base de iprodiona ($150 \text{ mL p.c./100 L água}$) na concentração recomendada para *B. cinerea*, a fim de avaliar o risco de exposição na fase inicial do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Os embriões de *G. gallus domesticus* foram expostos aos tratamentos controle por um período de 72h com umidade e temperatura controladas. Posteriormente foi realizada a coleta dos embriões, feita a preparação das lâminas permanentes contendo os embriões. Foram analisadas as porcentagens de viabilidade, sobrevivência, normalidade dos embriões, estágios do desenvolvimento embrionário, malformações anatômicas e a frequência cardíaca (bpm) dos embriões. Também foi realizada análise (qualitativa descritiva) morfológica de lâminas permanentes contendo os embriões. As taxas de viabilidade dos ovos foram significativas, atingindo altas taxas de eclodibilidade. Para a variável frequência cardíaca o controle fechado apresentou os maiores resultados ($137,82 \text{ bpm}$) e o com OE de pitangueira foi o que apresentou o menor resultado, com $123,53 \text{ bpm}$. Todos os tratamentos aos quais os embriões foram expostos apresentaram algum tipo de malformação. Dentre as malformações encontram-se malformações na região cefálica, do tronco e caudal, curvatura do corpo e fechamento do tubo neural. Os resultados obtidos durante a pesquisa informam que tanto os OEs quanto o fungicida Rovral podem interferir no desenvolvimento embrionário de vertebrados como as aves, podendo ser também agressivos aos demais grupos de vertebrados.

Palavras-chave: Produtos Fitossanitários. Controle Alternativo. Vertebrados. Malformações. Desenvolvimento Embrionário.

ABSTRACT

PILONETTO, Jéssica Cousseau. TOXICITY OF ESSENTIAL OILS OF PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.) AND PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.) THE EMBRYO OF POULTRY (*Gallus gallus domesticus* L.). 45 f. Course Conclusion Paper (Undergraduate in Biological Sciences - Degree) Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

The process of modernization of agriculture has been going on since the 60's as a way to meet the population demand. This process also causes a large increase in the use of phytosanitary products. Thinking about this factor and mainly on human health and the environment, it is necessary to search for alternative methods in the control of plant diseases inherent to crop production. Management aiming at the control of fungal diseases by the use of plant extracts is an alternative that is being studied in the scenario of Plant Production. Among plant extracts, it is known that the use of essential oils (EOs) can control fungal mycelial growth, preventing their proliferation both pre and post harvest. In this way the patchouli and pitangueira EOs act in the control of *Botrytis cinerea*, causative agent of gray mold in several agricultural crops. The present work aimed to evaluate, through in vitro bioassay, the embryotoxicology of the effective concentration of patchouli ($1877.16 \mu\text{g mL}^{-1}$) and pitangueira ($970.66 \mu\text{g mL}^{-1}$) EOs and also an iprodione-based synthetic fungicide. (150 mL pc / 100 L water) at the recommended concentration for *B. cinerea* in order to assess the risk of exposure at the early stage of embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. *G. gallus domesticus* embryos were exposed to control treatments for a period of 72h with controlled humidity and temperature. Subsequently, the embryos were collected and the permanent slides containing the embryos were prepared. The percentages of viability, survival, normality of the embryos, stages of embryonic development, anatomical malformations and heart rate (bpm) of the embryos were analyzed. Morphological (qualitative descriptive) analysis of permanent slides containing embryos was also performed. Egg viability rates were significant, reaching high hatchability rates. For the heart rate variable, the closed control presented the highest results (137.82 bpm) and the pitangueira EO showed the lowest result, with 123.53 bpm. All treatments to which the embryos were exposed showed some form of malformation. Malformations include cephalic, trunk and caudal malformations, body curvature, and neural tube closure. The results obtained during the research inform that both EOs and Rovral fungicide can interfere in the embryonic development of vertebrates such as poultries, and may also be aggressive to other vertebrate groups.

Keywords: Phytosanitary Products. Alternative control. Vertebrates. Malformations. Fetal development.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático do ovo de *G. gallus domesticus*. A) Indicações das partes do ovo de *G. gallus domesticus*; B) Local de injeção das soluções teste na câmara de ar de ovos de *G. gallus domesticus*.....22
- Figura 2** - Estufa de incubação de ovos fabricada por profissional qualificado. A) Parte interna e B) Parte externa da incubadora.....23
- Figura 3** - Coleta dos embriões de *Gallus gallus domesticus* após 72 horas de incubação A) Processo de abertura da casca do ovo de *G. gallus domesticus* e B) Observação do embrião vivo de *Gallus gallus domesticus*.....24
- Figura 4** - Montagem total dos embriões vivos de *Gallus gallus domesticus*: A) Fixação do embrião de *Gallus gallus domesticus* em papel filtro utilizando fixador Carnoy. B) Embrião sendo colocado em cassete. C) Embriões postos em fixador Carnoy.....24
- Figura 5** - Padronização dos estágios embrionários de *Gallus gallus domesticus*, A) Estágio 16, B) Estágio 17 e C) Estágio 18.....26
- Figura 6** - Frequência relativa de viabilidade dos embriões de *Gallus gallus domesticus* incubados por 72 horas do controle fechado (CF), controle veículo (CV, Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Nelder e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância.....27
- Figura 7** – Frequência relativa de sobrevivência dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Nelder e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância28
- Figura 8** - Frequência cardíaca (bmp) dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise realizada a partir do método de Poisson, com função de ligação *long-link*.....30
- Figura 9** - Embriões de *Gallus gallus domesticus* com disgenesia crânio-cefálica. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do tratamento com óleo essencial de patchouli, B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do tratamento com óleo essencial de patchouli, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 sob efeito do tratamento com óleo essencial de pitangueira.....31
- Figura 10** - Embriões de *Gallus gallus domesticus* com outras malformações na região cefálica. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitangueira apresentando falha nas subdivisões das vesículas encefálicas, B) e C) Embriões de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 e 17 respectivamente sob efeito do fitossanitário sintético (Rovral – a base de iprodiona) apresentando

malformação crânio cefálica, D) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitangueira com atrofia na região cefálica, E) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob tratamento de controle fechado com atrofia na região cefálica, F) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob efeito do fitossanitário sintético (Rovral – a base de iprodiona) com cabeça bífida.....32

Figura 11 - Embriões de *Gallus gallus domesticus* com malformações na região caudal e abdominal. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitangueira apresentando atrofia caudal, B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 sob efeito do óleo essencial de patchouli apresentando disgenesia caudal, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do controle veículo (Tween 80[®] a 1%) com gastrosquise.....33

Figura 12 – Frequência relativa e embriões de *Gallus gallus domesticus* normais do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Nelder e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância.....34

Figura 13 - Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* considerados normais. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob efeito do controle veículo (Tween[®] 80 a 1%), B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial patchouli, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob controle fechado.....35

Figura 14 - Estágios de desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* nos tratamentos com óleos essenciais (patchouli e pitangueira), controle fechado, controle veículo (Tween[®] 80 a 1%) e o fungicida Rovral (a base de iprodiona).....36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Agricultura Brasileira	13
2.2	Produtos Fitossanitários no Brasil	14
2.3	Óleos Essenciais	15
2.3.1	Patchouli - <i>Pogostemon cablin</i> Benth.	17
2.3.2	Pitangueira - <i>Eugenia uniflora</i> L.	17
2.4	Uso de embrião de ave como modelo de estudos toxicológicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Modelo biológico	20
3.2	Desenho experimental	20
3.3	Método de exposição	21
3.4	Coleta dos embriões e análise morfológica	23
3.5	Análise estatística	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Viabilidade, sobrevivência e frequência cardíaca	27
4.2	Análise morfológica e de Estágios	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1INTRODUÇÃO

Devido ao aumento populacional, a demanda por alimentos vem crescendo gradativamente. Como forma de garantir a distribuição de alimentos no mundo é necessária, além de medidas econômicas, uma agricultura bastante rentável (GODOY & OLIVEIRA, 2014). Essa busca por áreas de cultivo rentáveis faz com que aumente também o uso de produtos fitossanitários, assegurando a produção agrícola atual.

Após a Segunda Guerra Mundial, o uso intensivo de fitossanitários para eliminar insetos fitopatogênicos, parasitas e fungos na agricultura gerou uma grande revolução agrícola (PRAIA; GIL-PÉREZ; VILCHES, 2007). De acordo com os autores a Comissão Mundial do Meio Ambiente e do Desenvolvimento (1980) já alertava quanto ao uso exacerbado destes produtos considerando-os de alto risco para a saúde humana, podendo causar malformações congênitas e cancro, contaminando peixes, mamíferos e aves.

Desde a década de 60 o Brasil vem passando por um intenso processo de modernização na agricultura fazendo uso de organismos geneticamente modificados (OGM), e o uso intensivo de produtos fitossanitários. Tudo isso causa impactos no solo, água, na flora e fauna que se localizam próximas às áreas de cultivo (AGRA & SANTOS, 2001; GREENPEACE, 2017). O modelo de agricultura atual tem impactado, por exemplo, as abelhas, responsáveis pela polinização da maioria das espécies cultiváveis no mundo todo (CALDAS; PINHO e ZALUSKI, 2018).

Pelas condições climáticas encontradas no Brasil, o acúmulo de pragas nas lavouras é maior do que em países onde ocorre frio intenso, favorecendo assim o desenvolvimento dos insetos que comprometem as produções agrícolas e aumentando o consumo de produtos fitossanitários. O uso em excesso dos fitossanitários pode ocasionar a mortalidade dos predadores naturais dos insetos, aumentando o risco de doenças em plantas e animais podendo levar ao desequilíbrio biológico (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003).

Estudos com óleos essenciais (OEs) vem sendo realizados desde o século XX, como forma alternativa ao uso excessivo de fitossanitários (BETTIOL & MORANDI, 2009). Os OEs são considerados extratos de fácil obtenção, podendo causar a mortalidade de insetos, sua repelência, inibição de oviposição, limitar o desenvolvimento larval, além de inibir a fertilidade de insetos adultos. Mas apesar de

serem menos agressivos ao meio ambiente, também podem causar alterações em organismos não-alvo, tanto invertebrados quanto vertebrados (FONSECA et al., 2015; SILVA, 2011; OLIVEIRA & VENDRAMINI, 1999).

Dentre os vertebrados, o uso de embriões de *Gallus gallus domesticus* possibilita estudos relacionados a embriotoxicologia de produtos químicos que apresentam toxicidade para aves e mamíferos (YAMAMOTO et al., 2012). O que torna fácil este tipo de estudo é que os embriões conseguem se desenvolver fora do corpo materno, apresentam um desenvolvimento relativamente curto e semelhante ao dos mamíferos nos três primeiros dias (MATTSSON et al., 2015; KMECIK, 2014; MORE & PERSAUD, 2008).

O presente trabalho objetiva analisar os possíveis efeitos toxicológicos que os agentes de controle alternativo *Pogostemon cablin* Benth. e *Eugenia uniflora* L., e o fungicida sintético a base de iprodiona (Rovral[®] SC) possam ocasionar durante o processo de desenvolvimento embrionário de vertebrados tendo como base o desenvolvimento de *G. gallus domesticus*. Tal conhecimento poderá contribuir na substituição, caso sejam seguros, dos produtos fitossanitários sintéticos pelos agentes de controle alternativo como, por exemplo, os OEs.

Os efeitos dos OEs têm sido muito estudados atualmente devido a suas propriedades inseticida, fungicida e antimicrobiana. Porém, é necessário investigar sobre a segurança na sua utilização como método alternativo no controle de fitopatógenos. Ademais, existem poucos estudos a respeito da sua biossegurança em relação ao desenvolvimento embrionário. Assim, sendo o embrião de ave, um modelo biológico acessível, de fácil manipulação e muito conhecido, este permite análises de embriotoxicidade que podem contribuir no aumento do conhecimento a respeito da toxicidade dos OEs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agricultura Brasileira

A história da agricultura no Brasil é datada desde a sua descoberta, no ano de 1500, com a chegada dos colonizadores que trouxeram consigo alguns animais e plantas, que se juntaram aos povos aqui já existentes e desenvolveram a atividade agrícola (REIFSCHNEIDER, 2010). O mesmo autor relata que o crescimento das produções agrícolas podem ocasionar impactos tanto positivos quanto negativos para as diferentes regiões brasileiras. Ainda no período de 1500 se instalou no Brasil, através da atividade monocultora, a mão de obra escrava tanto indígena quanto negra, que passa a ser uma necessidade para as colônias da América (JÚNIOR, 1976).

Em 1960 foi implantado no Brasil o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) a fim de fortalecer este setor da economia brasileira. Além de promover estratégias de desenvolvimento rural brasileiro, tornou-se com o passar dos anos um dos maiores *players* do mercado de *commodities* internacional sendo modelo de políticas inclusivas no campo (BUAINAIN, 2014).

Nas décadas de 60 e 70 a agricultura brasileira passou por um grande processo de modernização, buscando atender a demanda de alimentos ocasionada pelo crescimento populacional e os índices de exportação, proporcionando também um aumento do uso de máquinas, adubos e defensivos químicos, esse período ficou conhecido como Revolução Verde (AGRA & SANTOS, 2001). Com o crescimento da produtividade em ambientes tropicais, tem-se também um aumento de animais fitopatógenos que acometem as lavouras (BUAINAIN, 2014), o que faz com que os agricultores utilizem produtos fitossanitários como principal forma defensiva ao controle dos fitopatógenos.

Segundo Agra e Santos (2001), na década de 90 a agricultura foi marcada pela globalização, corroborando com a transnacionalização da agricultura. Surgiu neste período uma grande preocupação com a saúde populacional e a tentativa de diminuir o uso de produtos fitossanitários nas lavouras contrariando os métodos estabelecidos pela Revolução Verde. Atualmente a agricultura brasileira passa por diversas modificações, podendo estar relacionadas a questões econômicas, sociais, culturais, ambientais, mercadológicas e tecnológicas (EMBRAPA, 2018). De acordo

com a Embrapa (2018) para se definir a agricultura nas próximas décadas é preciso observar os sinais e tendências relacionadas a esta prática, prevendo modificações e favorecendo a pesquisa, inovação e desenvolvimento.

2.2 Produtos Fitossanitários no Brasil

Os produtos fitossanitários são compostos químicos empregados na agricultura para manter o equilíbrio dos fitopatógenos que atacam plantações agrícolas (TERRA, 2008). De acordo com a Lei 7.802/89, sancionada em 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são: “produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de floretas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Art. 2, § 1, item a). Pelaez et al. (2010) afirmam que o produto ativo dos fitossanitários ocorre através de um elemento presente em sua composição que atua sobre a atividade biológica de alguns organismos vivos.

O uso de produtos fitossanitários é bastante longínquo, um dos primeiros produtos a ser utilizado foi o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), que em 1939 teve seu marco inicial na indústria de fitossanitários. Já no Brasil o produto se instalou nos anos 1943, mas foi somente após a Segunda Guerra Mundial que a indústria de produtos fitossanitários começou a evoluir, tornando-se estável no Brasil na década de 1970 (SPADOTTO, 2004). No final dos anos 1950, Carson (1962) relata em seu livro “Primavera Silenciosa” os danos causados ao meio ambiente e aos seres humanos procedentes do uso do DDT.

A lei 7.802/89 citada anteriormente que decreta o uso de fitossanitários no Brasil busca monitorar a comercialização e a finalidade destes, diferente de outros países que visam à redução dos efeitos causados pela aplicação desses produtos (ALVES FILHO, 2002). O Brasil se encontra classificado entre os maiores consumidores de fitossanitários do mundo, sendo o maior consumo principalmente nos estados do Mato Grosso e Paraná (SANTANA et al., 2013; SCHNEIDERS, 2018). O uso intensivo de produtos fitossanitários pode ser considerado um problema de saúde pública, em relação a esse fator diversas pesquisas científicas

vem sendo feitas em diferentes ambientes brasileiros (FREITAS E BOMBARDI, 2018).

É possível salientar que a demanda pelo uso de produtos fitossanitários está interligada ao processo de modernização da agricultura decorrente desde a década de 60 (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003). Desde então houve um exagero na utilização desses produtos, o que culminou na crescente degradação dos agroecossistemas. Para Saminéz (2008, p.5) “a restituição da biodiversidade vegetal permite o restabelecimento de inúmeras interações entre o solo, as plantas e os animais, resultando em efeitos benéficos para o agroecossistema”.

Para Campanhola & Bettiol (2003) o uso intenso de fitossanitários dentro de agroecossistema pode causar a mortalidade dos inimigos naturais daqueles insetos considerados fitopatógenos e aumentar as doenças em plantas e animais, ocasionando um desequilíbrio biológico. Se encontra no Congresso Nacional o Projeto de Lei 6670/2016 a qual institui a Política Nacional de Redução de Agrotóxicos (PNaRA) e para que esta ela seja sancionada é necessário a assinatura da população em geral, que esteja a favor da redução do uso deste produtos que vem causando diversos efeitos ao meio ambiente e a saúde humana.

Devido aos desequilíbrios ocasionados pelo uso de produtos fitossanitários, se faz necessária a busca por produtos alternativos no controle de pragas e doenças. Estudos relacionados à produtos alternativos aos fitossanitários ocorrem desde o século XX, sendo uma das opções os OEs (BETTIOL & MORANDI, 2009). Desde então vários trabalhos foram publicados utilizando-se OEs no controle de doenças em plantas e também de insetos que comprometem as lavouras (LORENZETTI et al., 2011).

Embora os OEs sejam efetivos no controle de doenças e insetos pragas nas lavouras, também podem causar alterações em organismos não-alvos (FONSECA et al., 2015; SILVA et al., 2011). De acordo com Oliveira e Vendramim (1999) os extratos e óleos são de fácil obtenção, podem causar mortalidade dos insetos, sua repelência, inibição de oviposição, restringir o desenvolvimento larval, além de inibir a fertilidade dos adultos.

2.3 Óleos Essenciais

Apesar de receber o nome OEs, esse material não apresenta oleosidade da qual se está acostumado a observar em óleos comuns (SERAFINI et al., 2002), é líquido em temperatura ambiente, tem origem vegetal, emanam odores característicos do vegetal em que foi extraído (SANTOS, 2011). De acordo com Serafini et al. (2002) os povos antigos empregavam os OEs em rituais religiosos, para fins medicinais e também em pinturas faciais. Os OEs segundo Santos (2011) podem ser extraídos das folhas, frutos, caules, raízes, entre outros, embora para algumas espécies de plantas nem todos esses órgãos liberam óleos para fins comerciais. Segundo este autor a produção dessas substâncias está intimamente ligada á influencias externas como atração de polinizadores, repelente ou biocida, proteção ao calor ou frio, controle de doenças e herbivoria.

Os óleos podem ser constituídos por diversas substâncias em diferentes concentrações principalmente por hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até mesmo por enxofre. As substâncias que se apresentam em maior concentração são chamadas de majoritárias e os de menor concentração são os traços (SERAFINI et al., 2002). O Brasil no período da Segunda Guerra Mundial obteve grande destaque na produção de óleo essencial de menta utilizado na indústria farmacêutica, produtos de higiene e na tabacaria. Obtendo grande importância econômica e ficando entre 63,7 e 80,8% da produção mundial (WATANABE et al., 2006).

A extração dos OEs ocorre por vários métodos tais como hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enflouragem, gases supercríticos e micro-ondas (SANTOS et al., 2004), sendo que o método de extração mais utilizado pelas indústrias é o de hidrodestilação que envolve técnicas de arraste a vapor e coobação (SANTOS et al., 2004; BIZZO et al., 2009; SANTOS et al., 1998). Para Sant'ana et al. (2010, p.1263) diversos fatores podem influenciar a composição dos óleos, “ tais como, efeitos ambientais (umidade, temperatura e luminosidade), cultivar e origem do material, práticas agrícolas, maturidade e tratamento pós colheita”.

Existem cerca de 3000 plantas utilizadas para extração de OEs, mas apenas 300 são comercializadas mundialmente como essências (RAMYA et al., 2013). O processo de desenvolvimento deste trabalho ocorrerá com os óleos de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

2.3.1 Patchouli - *Pogostemon cablin* Benth.

Descrita por Benth, o patchouli cientificamente conhecido por *Pogostemon cablin* pertence a família Lamiaceae. O OE de patchouli possui propriedades aromáticas, medicinais e antibacterianas, sendo empregado na fabricação de cosméticos, incensos, produtos de higiene oral e pós barba (RAMYA et al., 2013; COSTA et al., 2013; SANT'ANA et al., 2010).

De acordo com o descrito por Sant'ana et al. (2010), o OE de patchouli é extraído das folhas secas da planta pela técnica de destilação a vapor, ficando entre os 18 OEs de maior incidência de exportação no mundo. O patchouli apresenta odor balsâmico amadeirado com minúcias herbáceas e florais. Para os autores, condições como qualidade do material foliar, destilação, folhas envelhecidas, a idade da planta e técnicas de cultivo, além de fatores como a adubação, irrigação e espaçamento influenciam na formação do óleo.

Silva (2011, p.872) descreve que o patchouli “é uma planta pouco estudada e que produz grande quantidade de óleos essenciais e apresenta, potencial como planta inseticida”. Estudos realizados por Silva (2011) aponta o *P. cablin* sendo utilizado no controle alternativo da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* - Lepidoptera: Plutellidae) no cultivo de brássicas, o qual manifestou toxicidade causando a morte de 65% dos insetos.

Testes *in vitro* foram realizados por Pattnaik et al. (1996) em vinte e duas espécies de bactérias e doze de fungos, tendo como resultado a inibição de vinte das cepas e os doze fungos analisados. Já Mattos (2010), em sua pesquisa *in vivo* utilizando diversos OEs, entre eles o patchouli, no controle do bolor verde da laranja causado pelo fungo *Penicillium digitatum*. Concluiu que apenas concentrações de 10.000 e 100.000 ppm foram eficientes na inibição do fungo. Sendo que nessas concentrações o OE de patchouli pode causar fitotoxicidade alterando propriedades do fruto (laranja pera).

2.3.2 Pitangueira - *Eugenia uniflora* L.

Eugenia uniflora L. (pitanga) pertence à família Myrtaceae, nativa do Brasil, com ocorrência na América Latina, pode manifestar propriedades farmacobotânicas, químicas, farmacológicas (AURICCHIO e BACCHI, 2003, AURICCHIO et al., 2007) e

também antifúngica (LIMA et al., 2006). Auricchio et al. (2007) relata o uso das folhas de *E. uniflora* na medicina popular com propriedades anti-hipertensivas e anti-reumáticas, seu extrato alcoólico é empregado no tratamento de bronquites, tosse, febre, ansiedade, hipertensão arterial e verminoses.

Estudos realizados por Lima et al. (2006) apontam resultados eficazes de *E. uniflora* na inibição de pelo menos uma das cepas de *Candida* estudadas. Para Jung et al. (2013), em suas pesquisas sobre potencial inseticida do OE de *E. uniflora*, obtiveram resultados positivos no controle de formigas da espécie *Atta laevigata*, também conhecidas como saúvas. Mazaro et al. (2008) testaram a indução de fitoalexinas¹, por meio de extrato alcoólico e OE de pitangueira em cotilédones de soja (*Glycine max*). Os resultados obtidos sugerem o uso do OE de pitangueira no controle alternativo de patógenos em plantações.

2.4 Uso de embrião de ave como modelo de estudos toxicológicos

Embriões da ave *Gallus gallus domesticus* servem como modelo de estudos de embriotoxicidade de produtos químicos para aves e mamíferos (YAMAMOTO et al., 2012). Esses estudos são favorecidos pelo simples fato dos embriões se desenvolverem fora do corpo da mãe, facilitando análises das reações causadas por substâncias químicas no processo de desenvolvimento embrionário, além de apresentar um desenvolvimento curto e semelhante ao dos mamíferos nos primeiros estágios (MATTSSON et al., 2015, KMECIK, 2014). Por apresentarem inúmeras vantagens com relação a outras espécies, as aves compõe um dos modelos de estudo mais utilizados em laboratório no que diz respeito à pesquisas de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento (KMECIK, 2014).

Para Schoenwolf (1999), existem alguns aspectos que propiciam os estudos de toxicologia com embriões de ave, tais como: são ovos megalócitos – devido apresentar reservas nutricionais e não apresentam dependência do ambiente externo ou materno para seu desenvolvimento, constituem de membranas envoltórias bem desenvolvidas, desenvolvimento relativamente curto – 21 dias, ausência do organismo materno para desenvolvimento permitindo ser realizado em laboratório. A

¹ São metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta aos estresses que podem ocorrer sejam eles biológicos, físicos ou químicos.

taxa de desenvolvimento dos embriões pode estar relacionada a fatores genéticos (tempo de desenvolvimento de cada espécie de ave) ou ambientais (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dos experimentos ocorreu no Laboratório de Controle Biológico II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos. Os experimentos e a análise morfológica foram realizados no decorrer do primeiro semestre de 2019, já a análise morfométrica e estatística foram desenvolvidas no segundo semestre de 2019. Para a realização deste trabalho foi necessária a avaliação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UTFPR), sob protocolo de número 2018-022/2018.

3.1 Modelo biológico

Durante o processo foram utilizados ovos fertilizados de *G. gallus domesticus* pesando entre 60 e 65 g cada, e sem rachaduras, sendo estes ovos oriundos de matrizes pesadas. Os ovos foram adquiridos de incubatórios comerciais situados na cidade de Dois Vizinhos no Paraná. Os mesmos foram comprados e transportados com recursos particulares até o Laboratório de Controle Biológico II da UTFPR onde foram desenvolvidos os experimentos. Os ovos foram previamente higienizados com álcool etílico 70% (borrifado no ovo) e secado com papel toalha, sendo identificados de acordo com os grupos experimentais expressos na Tabela 1.

3.2 Desenho experimental

O desenho experimental foi dividido em cinco grupos conforme apresentado na Tabela 1, tendo como agentes de controle alternativo óleos essenciais (OEs) de patchouli (*P. cablin*) e pitangueira (*E. uniflora*), e como produto fitossanitário sintético (PFS) o fungicida a base de iprodiona (Rovral® SC), seguindo as recomendações explícitas pelo fabricante (150 mL p.c./100L água) sendo este último utilizado no controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) do morango (*Fragaria* spp.). Foram utilizados 150 ovos, sendo 30 para cada um dos grupos experimentais referenciados. Os experimentos foram divididos em três réplicas para melhor desenvolvimento do trabalho, cada etapa contendo 50 ovos, ou seja, 10 de cada grupo experimental.

Tabela 1 - Grupos experimentais de óleos essenciais de *Pogostemon cablin* e *Eugenia uniflora*, fungicida Rovral® SC e Tween® 80 sendo injetados em ovos de *G. gallus domesticus* para teste de toxicidade

Grupos experimentais	Ovos	Qtde. ovos
(1) Grupo Controle fechado	Não injetados	30
(2) Grupo Controle veículo (Tween® 80 + soro fisiológico)	Injetados com 100 µL de solução de Tween® 80 a 1% em soro fisiológico	30
(3) Grupo OE* patchouli	Injetados com 100 µL de solução de óleo essencial de patchouli (<i>P. cablin</i>) 1877,16 µg.mL ⁻¹ em Tween® 80 a 0,5% em soro fisiológico	30
(4) Grupo OE* pitangueira	Injetados com 100µL de solução de óleo essencial de pitanga (<i>E. uniflora</i>) 970,76 µg.mL ⁻¹ em Tween® 80 a 0,25% em soro fisiológico	30
(5) Grupo PFS**	Injetados com 100 µL de solução de PFS - fungicida a base de iprodiona (Rovral® SC) a 5.000 µg.mL ⁻¹ em água destilada autoclavada	30
Totalizando		150

*OE – Óleo Essencial.

**FPS – Produto Fitossanitário Sintético, dose recomendada para a cultura do morangueiro: 150 mL p.c. por 100 L de água, $\rho = 500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Fonte: Arquivo pessoal (2019).

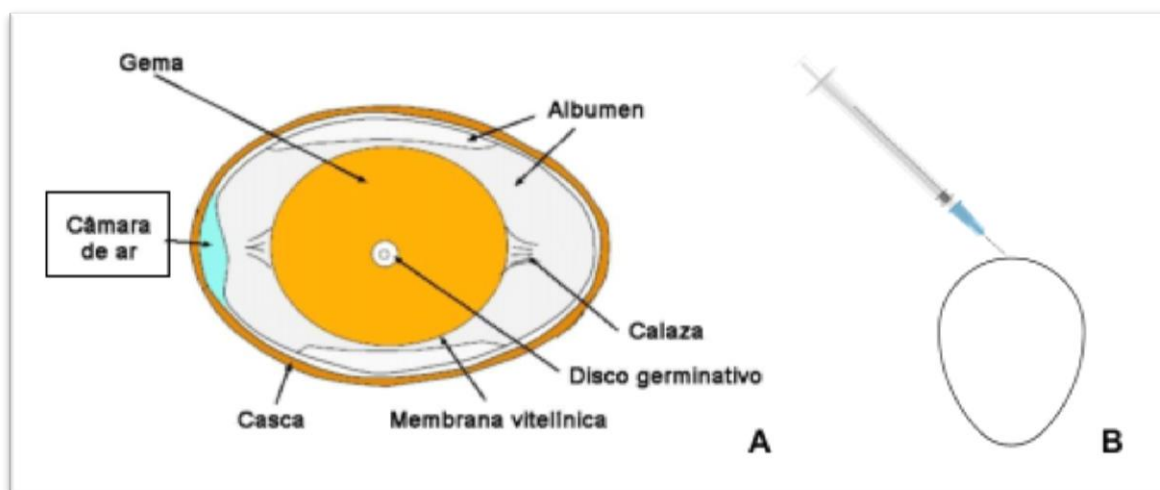
As soluções dos agentes de controle fitossanitário, bem como, as concentrações utilizadas estão de acordo com Vismara (2019). Deve-se ressaltar que as concentrações utilizadas de OEs foram as efetivas no controle do crescimento micelial radial do fungo filamentosso *Botrytis cinerea* Pers.:Fr *in vitro*, e para o PSF, foi a recomendada para o controle da doença mofo cinzento, causada por *B. cinerea*, na cultura do morangueiro (Tabela 1).

3.3 Método de exposição

A exposição dos ovos ocorreu em diferentes soluções no tempo E0, de modo a simular o máximo possível a situação de exposição no ambiente natural. Conforme descrito por Houenou e Oppenheim (1994) e Yaginuma et al. (2012), a literatura considera E0 o ovo logo após a postura, antes da incubação. Quando incubados, o E1 corresponde ao primeiro dia embrionário, E2 ao segundo dia embrionário e assim continuamente até chegar em E21 que corresponde ao dia de eclosão. Os ovos

foram posicionados com a câmara de ar voltada para cima conforme exposto na Figura 1. Posteriormente foram injetadas na câmara de ar as concentrações citadas no subitem anterior, pois a câmara de ar segundo Yamamoto et al. (2012) é o local onde ocorre melhor distribuição dos agentes durante o desenvolvimento embrionário. Todo o processo de diluição das concentrações e injeção dos ovos foi realizado dentro do fluxo para evitar contaminações durante o desenvolvimento do experimento.

Figura 1 - Desenho esquemático do ovo de *G. gallus domesticus*. A) Indicações das partes do ovo de *G. gallus domesticus*; B) Local de injeção das soluções teste na câmara de ar de ovos de *G. gallus domesticus*.



Fonte: Expedição Vida (2014).

Depois de serem injetadas as diferentes soluções nos ovos, estes foram selados com fita adesiva e incubados de forma que a câmara de ar ficasse voltada para cima, permanecendo na incubadora por três dias a uma temperatura de 38°C com umidade e ventilação constantes. A Figura 2 mostra a incubadora utilizada durante os procedimentos realizados no laboratório de Controle Biológico II da UTFPR.

Figura 2 – Estufa de incubação de ovos fabricada por profissional qualificado. A) Parte interna e B) Parte externa da incubadora

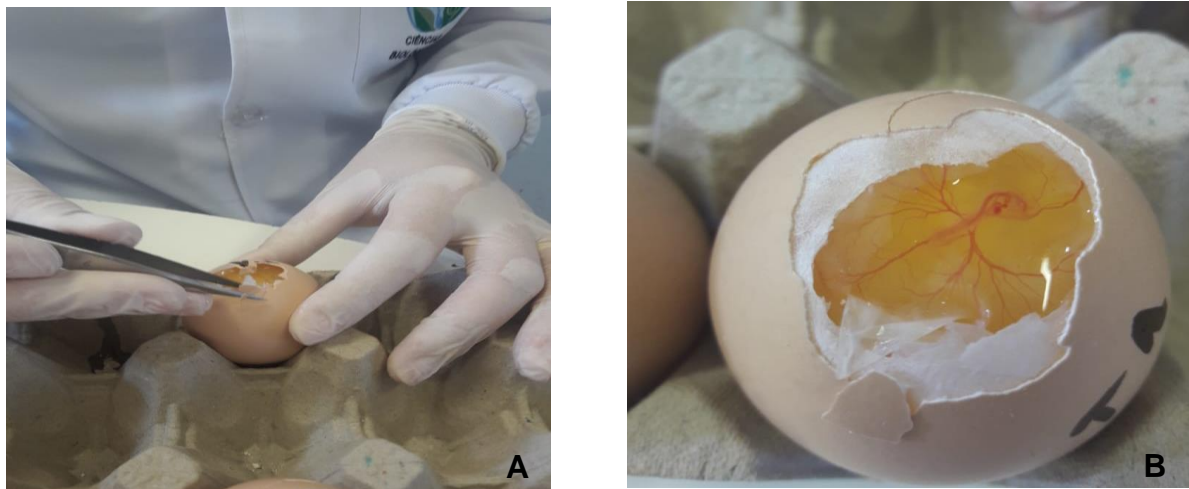


Fonte: Autora (2019).

3.4 Coleta dos embriões e análise morfológica

Após os três dias de incubação foi feita a coleta dos embriões para as análises de mortalidade, da frequência cardíaca e morfológica. Esta última, utilizando a técnica de montagem total descrita por Ortolani-Machado et al. (2012). O local onde se encontrava a fita inserida para tampar a fissura feita para injeção foi retirada com o auxílio de uma pinça. Fez-se uma abertura na casca do ovo com auxílio de tesoura e pinça, tornando possível a visualização do embrião (Figura 3). Em seguida contaram-se os batimentos cardíacos dos embriões vivos durante 15 segundos e este resultado foi multiplicado por 4. Foram considerados vivos os embriões possíveis de se contar os batimentos, mortos aqueles que não possuíam batimentos ou que era possível a visualização apenas do disco embrionário, e inviáveis os ovos que não apresentavam sinal algum de desenvolvimento. Os embriões foram eutanasiados por resfriamento de acordo com as normas descritas pelo CONCEA (2013).

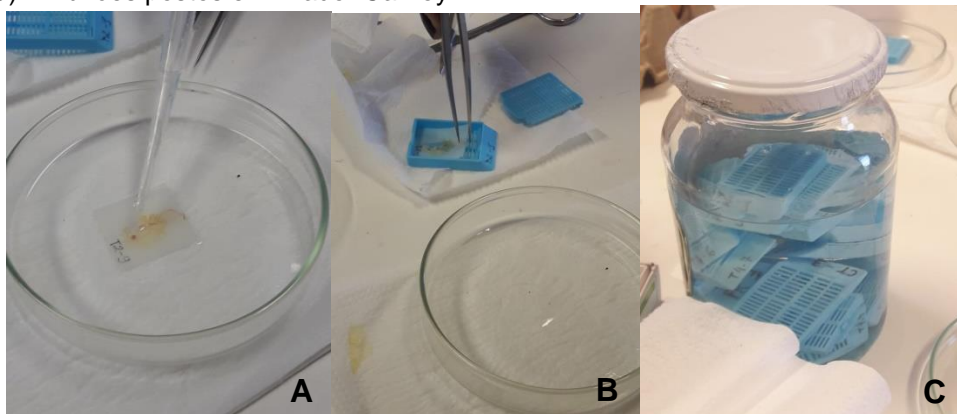
Figura 3 – Coleta dos embriões de *Gallus gallus domesticus* após 72 horas de incubação A) Processo de abertura da casca do ovo de *G. gallus domesticus* e B) Observação do embrião vivo de *Gallus gallus domesticus*.



Fonte: Autora (2019).

Após realização da eutanásia foi realizada a coleta dos embriões, sendo necessária tesoura e pinça para fazer o corte das membranas extraembrionárias em torno do embrião. O embrião foi coletado e colocado em solução fisiológica dentro de uma placa de petri para lavagem e remoção do vitelo. Após foi fixado e encaixado em papel filtro com recorte central em losango, gotejado uma gota de fixador Carnoy em cima do embrião. O embrião fixado no papel filtro foi colocado em caixa plástica, tipo cassete, para biópsia e posterior imersão no fixador onde permaneceu por no mínimo 2h e no máximo três dias à temperatura ambiente. Os procedimentos citados podem ser observados na Figura 4.

Figura 4 – Montagem total dos embriões vivos de *Gallus gallus domesticus*: A) Fixação do embrião de *Gallus gallus domesticus* em papel filtro utilizando fixador Carnoy. B) Embrião sendo colocado em cassete. C) Embriões postos em fixador Carnoy.

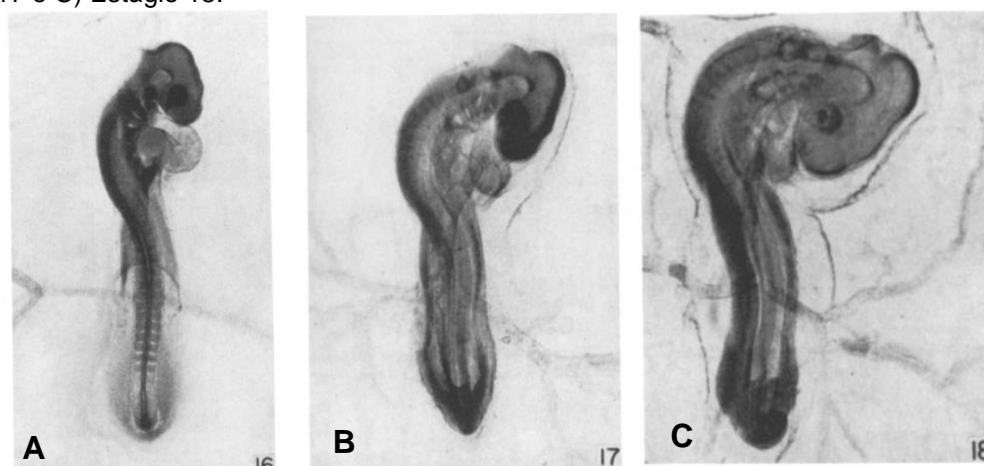


Fonte: Autora (2019).

Após a fixação, os embriões foram lavados com água destilada e imersos em álcool 70% por no mínimo 8h. Quando necessário a permanência por um período mais longo de tempo, foi preciso fazer a troca do álcool. Posterior a este procedimento foi realizada a coloração dos embriões por cerca de 48h utilizando corante Carmalumen de Mayer.

Em seguida foi realizado o processo de desidratação dos embriões em uma série crescente de álcool etílico. Na sequência foi realizada a diafanização em xilol, técnica empregada para retirada de impurezas de amostras teciduais deixando-as transparentes. Para a montagem dos embriões foi utilizado Bálsamo do Canadá sintético colocado em lâmina, sobre este foi alocado o embrião e, posteriormente, colocado lamínula sobre o embrião, deixando secar em posição horizontal. A análise morfológica dos embriões e registro fotográfico foram realizados com auxílio do software ZEN 2.3 LITE, utilizando estereomicroscópio (Zeiss, Stemi – 305) acoplado em uma câmera (AxiocamERc 5s). A determinação dos estágios embrionários foi realizada de acordo com a padronização descrita por Hamburger e Hamilton (1951) (Figura 5).

Figura 5 – Padronização dos estágios embrionários de *Gallus gallus domesticus*, A) Estágio 16, B) Estágio 17 e C) Estágio 18.



Fonte: Hamburger & Hamilton (1951).

3.6 Análise estatística

As variáveis respostas (ou variáveis dependentes) foram: ovos viáveis/inviáveis, sobrevivência/mortalidade dos embriões e embriões normais/anormais, frequência cardíaca (bpm) e estágios de desenvolvimento embrionário. Conseqüentemente, foi obtido o percentual de viabilidade; dado o

número de embriões viáveis determinou-se o percentual de sobrevivência; dado o número de embriões vivos obteve-se o percentual de embriões normais (embriões com ausência de malformações); dos embriões vivos, foram obtidos a frequência cardíaca (bpm) e ranqueado/ordenado o estágio de desenvolvimento embrionário por grupo experimental.

Para a realização da análise estatística sobre frequência cardíaca, normalidade dos embriões, taxa de sobrevivência e viabilidade dos ovos de *G. gallus domesticus* foi utilizado o Modelo Linear Generalizado (MLG), apresentado por Nelder e Wedderburn (1972). Já para o estágio de desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus* foi utilizado o teste proposto por Kruskal e Wallis (1952). Foi necessária a ferramenta computacional R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019) e os pacotes 'agricolae' 1.3-1 (MENDIBURU, 2019), 'nlme' 3.1-140 (PINHEIRO et al., 2019), 'multcomp' 1.4-10 (HOTHORN et al., 2008), 'tidyverse' 1.2.1 (WICKHAM, 2017), 'lme4' 0.9-37 (ZEILEIS; HOTHORN, 2002) e 'ggplot2' 3.2.0 (WICKHAM, 2016).

Desta forma, para aferir o potencial de eclodibilidade em relação ao desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus*, via as variáveis respostas, ovos viáveis/inviáveis, sobrevivência/mortalidade dos embriões e embriões normais/anormais, do ensaio de embriotoxicidade, aplicou-se a distribuição binomial. Essa é uma distribuição da família exponencial que modela dados de resposta binária: ocorrência ou não ocorrência de um evento.

Assim, o MLG permitiu estabelecer uma relação entre uma variável resposta binomial (ovos viáveis/inviáveis, sobrevivência/mortalidade dos embriões e embriões normais/anormais) e um grupo de variáveis preditoras (MCCULLAGH; NELDER, 1989; VISMARA, 2019). Esta relação modela a probabilidade transformada pela função de ligação *logit*, como uma relação linear das variáveis preditoras.

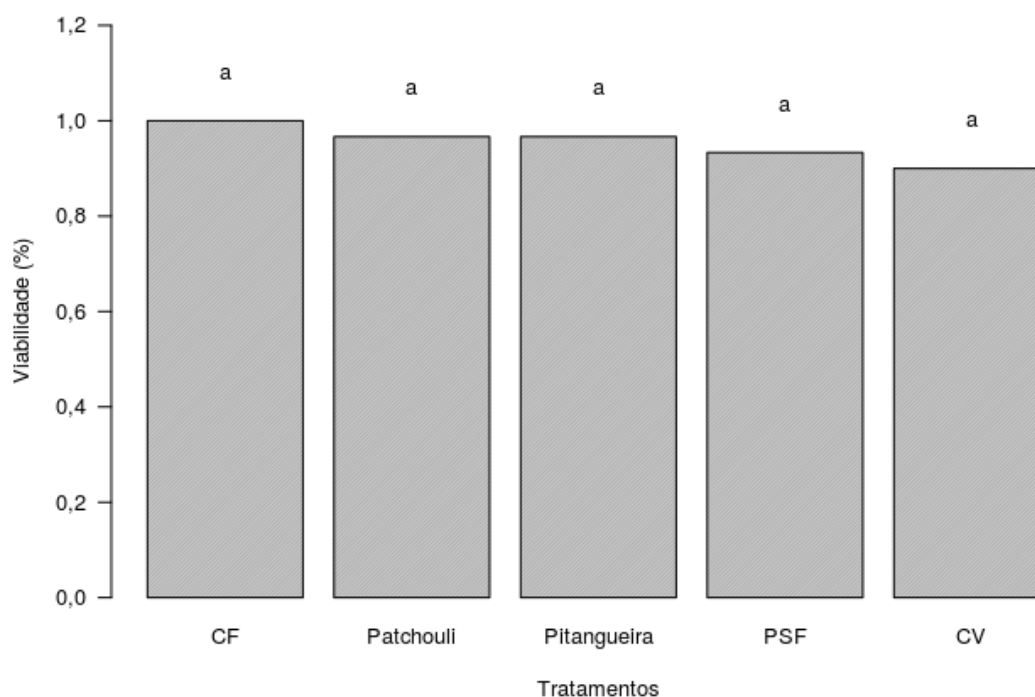
Já para a variável resposta estágio de desenvolvimento embrionário, efetuou-se o teste de Kruskal e Wallis (1952) por ser uma variável resposta ordinal (VISMARA, 2019). Ou seja, para esta variável foi realizada análise não-paramétrica (sem aplicação do MLG).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade, sobrevivência e frequência cardíaca

Assumindo que o grupo controle fechado apresentou 100% de viabilidade embrionária, e comparando aos demais tratamentos, foram encontradas 96,67% de viabilidade para o tratamento com OEs (patchouli e pitangueira), 93,33% para o tratamento com fitossanitário sintético e 90% para o grupo controle veículo (Tween[®] 80 a 1%), esses dados podem ser observados na Figura 6. Estatisticamente não foi observada diferença significativa entre o grupo controle fechado e os demais grupos.

Figura 6 – Frequência relativa de viabilidade dos embriões de *Gallus gallus domesticus* incubados por 72 horas do controle fechado (CF), controle veículo (CV, Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Neter e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância.

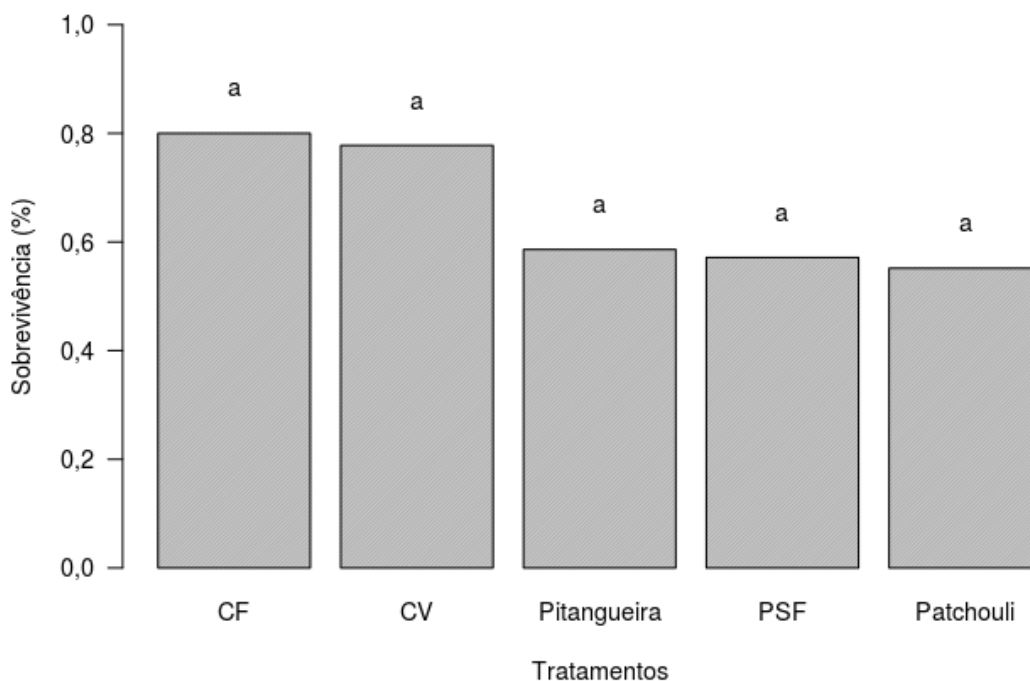


Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Os embriões tiveram um percentual de sobrevivência superior a 50% (Figura 7), não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. A taxa de

sobrevivência dos embriões observada no grupo controle fechado foi de 80%, no grupo controle veículo (Tween[®] 80 a 1%) foi de 77,78%, no tratamento com o OE de pitangueira foi de 58,62%, no produto fitossanitário sintético foi de 57,14% e no tratamento com OE de patchouli foi de 55,17%.

Figura 7 – Frequência relativa de sobrevivência dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitangueira e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Nelder e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância.



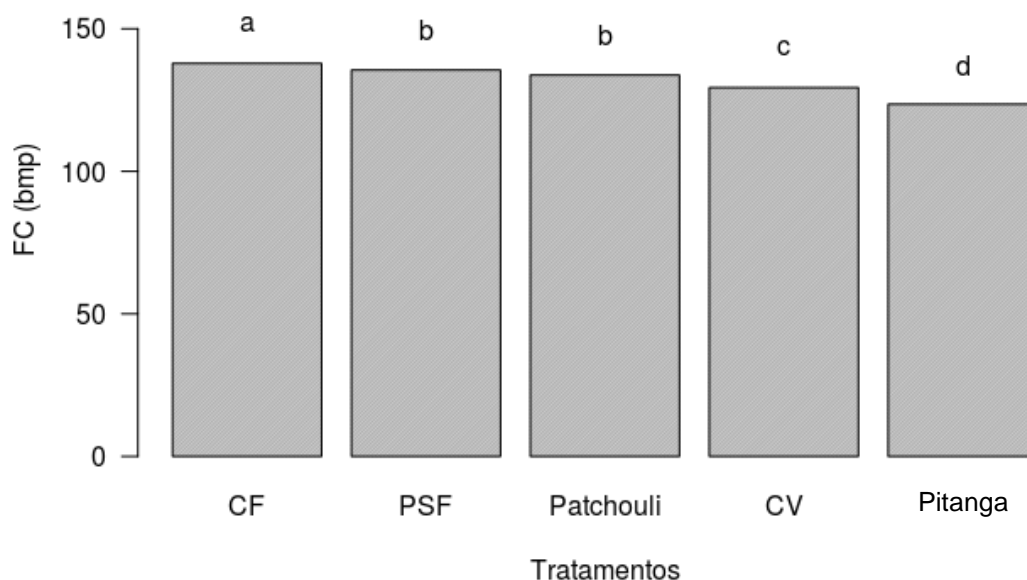
Fonte: Arquivo Pessoal (2019).

Zancanaro (2019) estudando os efeitos do OE de *Melaleuca alternifolia* sobre o desenvolvimento embrionário inicial de *G. gallus domesticus*, observou que os embriões do grupo controle fechado e os tratados com Tween[®] 80 a 1% apresentaram taxa de sobrevivência entre 80% e 90%. Neste mesmo estudo, os embriões que receberam tratamento com o fungicida Rovral apresentaram a menor taxa de sobrevivência. Outro estudo com embriões de ave utilizando OEs de citronela e guaçatonga sobre o desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus*, também demonstraram que os embriões do grupos controle fechado e

do grupo veículo (Tween[®] 80 a 1%) demonstraram taxa de sobrevivência maior que nos demais tratamentos (ROSSONI, 2019). Em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho, onde os embriões do grupo controle fechado e os do grupo controle veículo também apresentaram maior taxa de sobrevivência.

Para a variável resposta frequência cardíaca dos embriões de *G. gallus domesticus* aferida no momento da coleta (Figura 8), o grupo controle fechado (média de 137,82 bpm) diferiu dos demais tratamentos com a maior média. Para o tratamento com o produto fitossanitário sintético a frequência cardíaca média dos embriões foi de 135,50 bpm, seguida dos embriões do grupo com OE de patchouli com a média 133,75 bpm. Já para o grupo controle veículo, a média da frequência cardíaca dos embriões foi de 129,33 bpm, e para os embriões do grupo OE de pitangueira foi de 123,53 bpm diferindo dos demais tratamentos, com a menor média. Essa diferença nas médias da frequência cardíaca, entre o grupo controle fechado e os demais tratamentos, deve ser investigada a fim de verificar os possíveis danos ao embrião. Para isto, propõem-se aumentar o período de incubação dos ovos por um tempo superior a 72 h (três dias de incubação). Em um estudo utilizando diferentes concentrações de Cádmio e Ácido Perfluorooctanóico (PFOA) não foram observadas diferenças significativas nas médias da frequência cardíaca dos embriões nos diferentes tratamentos (KMECICK, 2017). Embora Kmecick (2017) tenha utilizado outros tratamentos pra análise toxicológica do desenvolvimento embrionário, os dados encontrados por ela afirmam o contrario da pesquisa realizada neste trabalho. Outro estudo realizado por Vismara (2019), utilizando as mesmas concentrações de OEs de patchouli e pitangueira, Tween[®] 80 a 1% e o fungicida sintético Rovral injetados em embrião de ave, demonstram que a FC dos embriões teve uma diferença significativa. Resultados estes idênticos aos analisados neste trabalho.

Figura 8 – Frequência cardíaca (bmp) dos embriões de *Gallus gallus domesticus* do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitanga e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise realizada a partir do método de Poisson, com função de ligação *long-link*.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Apesar da redução de temperatura interferir na frequência cardíaca, houve um cuidado em aferir essa variável imediatamente após a remoção dos ovos da incubadora, na tentativa de mitigar tal variação. Na maioria dos trabalhos utilizando embrião de *G. gallus domesticus* como modelo não é realizada a análise da frequência cardíaca. No entanto, a redução ou aumento da FC poderá influenciar a taxa de oxigenação das células e consequentemente alterar a taxa de crescimento do embrião.

4.2 Análise Morfológica e de Estágios

A análise morfológica foi realizada de acordo com o descrito por Hamburger e Hamilton (1951) após montagem total dos embriões (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Durante este processo foram encontrados embriões normais, ou seja, que não apresentaram malformação, e embriões malformados. As malformações encontradas durante o desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus* foram malformações relacionadas a região cefálica, do tronco e caudal, curvatura do corpo

e fechamento do tubo neural. Dentre as malformações na região cefálica apresentam-se a disgenesia crânio-cefálica, falha nas subdivisões das vesículas encefálicas, falha no fechamento do tubo neural. Nas demais regiões foram encontradas malformações como disgenesia caudal e atrofia caudal e, na região abdominal, gastrosquise. Dada a sua gravidade, essas malformações possivelmente levariam a óbito embrionário ou logo após o nascimento do pintainho. A principal causa de mortalidade infantil para humanos são as malformações congênitas (MOORE E PERSAUD, 2008).

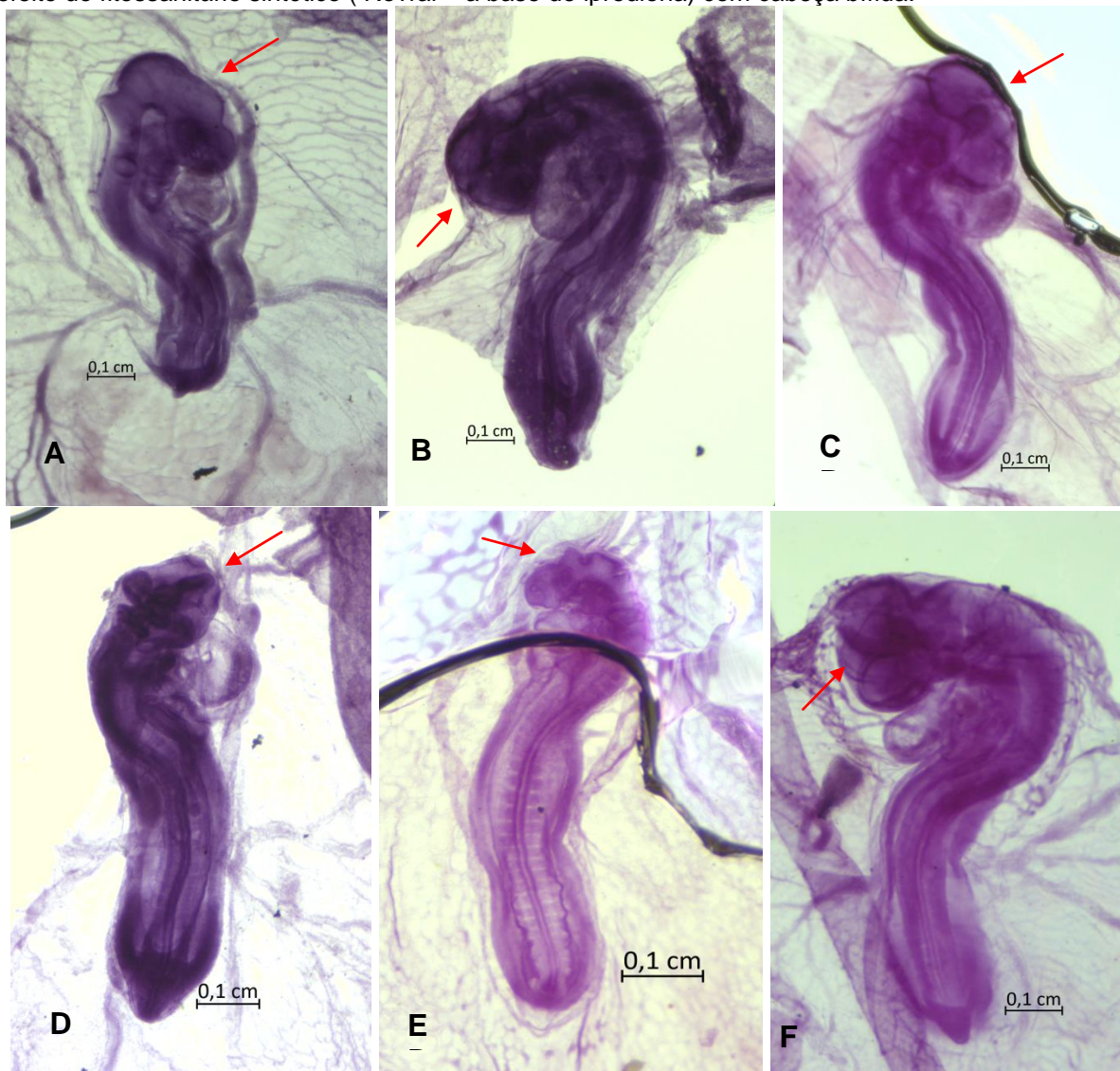
Na Figura 9 observa-se a ocorrência de malformações como a disgenesia crânio-cefálica, e a Figura 10 outras malformações relacionadas a cabeça. É importante salientar que de todas as malformações ocorridas nos embriões entre os tratamentos expostos, a maioria das malformações foram na região cefálica.

Figura 9 – Embriões de *Gallus gallus domesticus* com disgenesia crânio-cefálica (setas). A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do tratamento com óleo essencial de patchouli, B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do tratamento com óleo essencial de patchouli, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 sob efeito do tratamento com óleo essencial de pitangueira.



Fonte: Autora (2019).

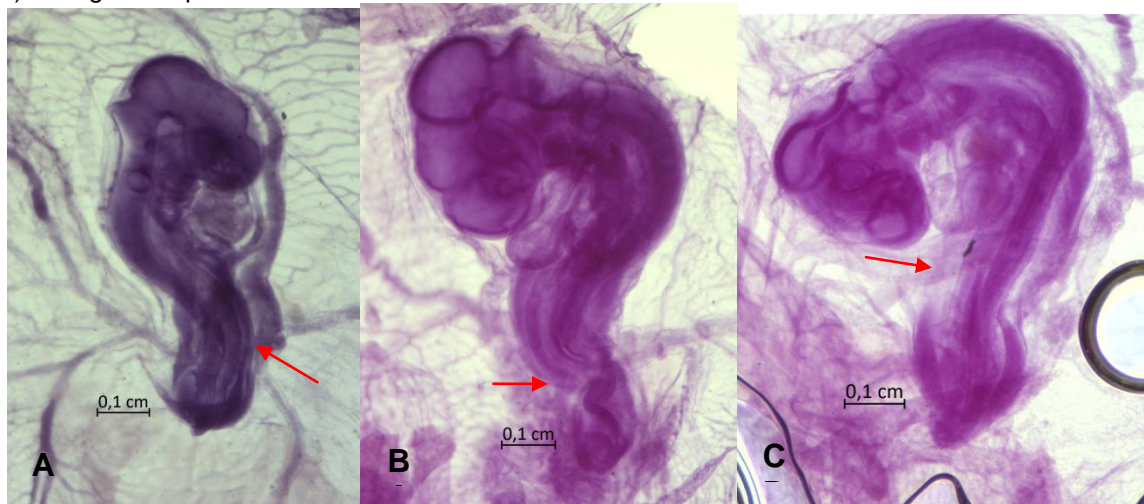
Figura 10 - Embriões de *Gallus gallus domesticus* com 72 horas de incubação apresentando outras malformações na região cefálica. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitangueira apresentando falha nas subdivisões das vesículas encefálicas, B) e C) Embriões de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 e 17 respectivamente sob efeito do fitossanitário sintético (Rovral – a base de iprodiona) apresentando malformação crânio-cefálica, D) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitangueira com atrofia na região cefálica, E) Embrião /de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob tratamento de controle fechado com atrofia na região cefálica, F) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob efeito do fitossanitário sintético (Rovral – a base de iprodiona) com cabeça bífida.



Fonte: Autora (2019).

Na Figura 11 é possível a observação de algumas malformações que ocorrem na regiões abdominal e caudal do embrião durante seu desenvolvimento.

Figura 11 - Embriões de *Gallus gallus domesticus* com 72 horas de incubação apresentando malformações na região caudal e abdominal. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial de pitanga apresentando atrofia caudal, B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 18 sob efeito do óleo essencial de patchouli apresentando disgenesia caudal, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do controle veículo (Tween 80® a 1%) com gastrosquise.



Fonte: Autora (2019).

Estudos realizados por Larentis et al. (2017) utilizando óleo essencial de patchouli (nas concentrações de 1% 0,75%) no desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus*, demonstraram malformações nos embriões. Dentre as malformações encontradas estão atrofia cefálica, agenesia caudal, dilatação do canal lacrimal e falhas no fechamento do tubo neural. Embora testado em outras concentrações, os dados obtidos por Larentis et al. (2017) sugerem que o OE de patchouli apresenta efeito toxicológico ao desenvolvimento embrionário de vertebrados como as aves, podendo ser tóxico também aos demais grupos de vertebrados.

Observa-se que os embriões expostos ao fungicida sintético apresentaram mais malformações em comparação aos embriões submetidos aos demais tratamentos. Arcain (2017) utilizou embriões de *Gallus gallus* para analisar os efeitos de diferentes concentrações de iprodiona. Durante a pesquisa constatou que dentre os embriões sobreviventes, poucos eram malformados, considerando o desenvolvimento normal semelhante aos resultados aqui descritos (Figura 12).

Na Figura 12 observa-se a taxa de desenvolvimento de embriões normais para todos os tratamentos, donde não se observou, ao nível de 5% de significância, diferença estatística entre as médias dos percentuais. Para o controle fechado o percentual foi de 95,83% de embriões normais, os menores percentuais foram do OE de pitangueira e do produto fitossanitário sintético com 73,33% de normalidade.

O controle veículo (Tween[®] 80 a 1%) teve 90% e o tratamento com patchouli apresentou 81,25% de embriões normais.

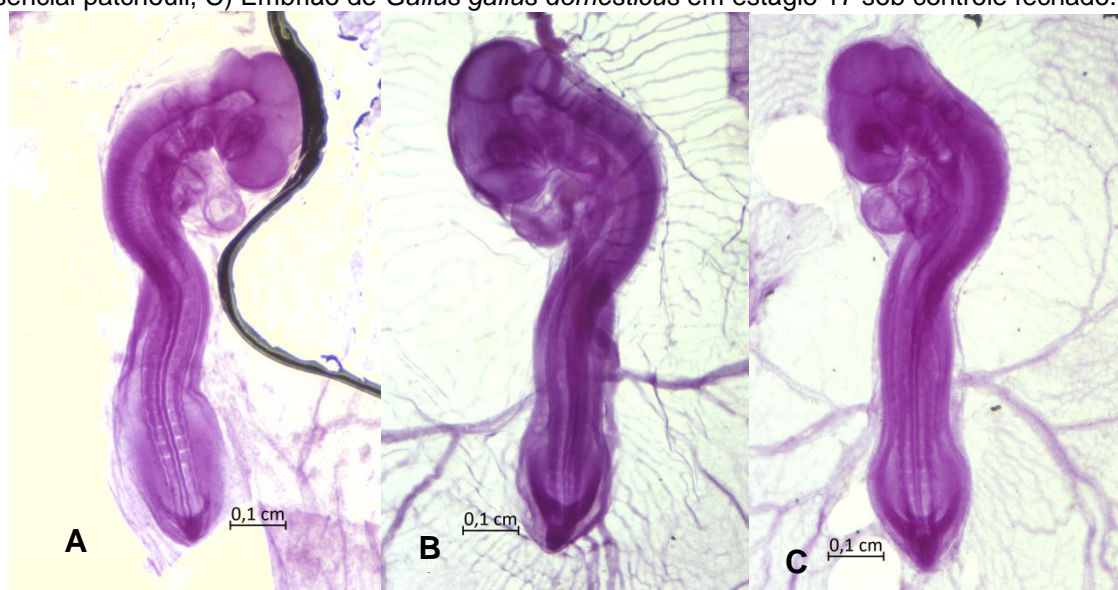
Figura 12 – Frequência relativa de embriões de *Gallus gallus domesticus* normais do controle fechado (CF), controle veículo (CV, com Tween[®] 80 a 1%), óleos essenciais de patchouli e pitanga e, o produto sintético fungicida (PSF) a base de iprodiona (Rovral[®] SC), incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes. Análise feita a partir do Modelo Linear Generalizado de Nelder e Wedderburn (1972), ao nível de 5% de significância.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

A Figura 13 exibe algumas imagens de embriões de *G. gallus domesticus* que não apresentaram malformações, sendo estes expostos em diferentes tratamentos.

Figura 13 – Estereofotografia de embriões de *Gallus gallus domesticus* com 72 horas de incubação considerados normais. A) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 16 sob efeito do controle veículo (Tween[®] 80 a 1%), B) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob efeito do óleo essencial patchouli, C) Embrião de *Gallus gallus domesticus* em estágio 17 sob controle fechado.



Fonte: Autora (2019).

Observa-se na Tabela 2 a distribuição dos embriões em cada um dos estágios de desenvolvimento. Para esta classificação seguiu-se a descrição de Hamburger e Hamilton (1951) sendo observadas características como tamanho dos brotos das asas e pernas, vesículas encefálicas, tamanho da cauda, curvatura e contagem dos somitos.

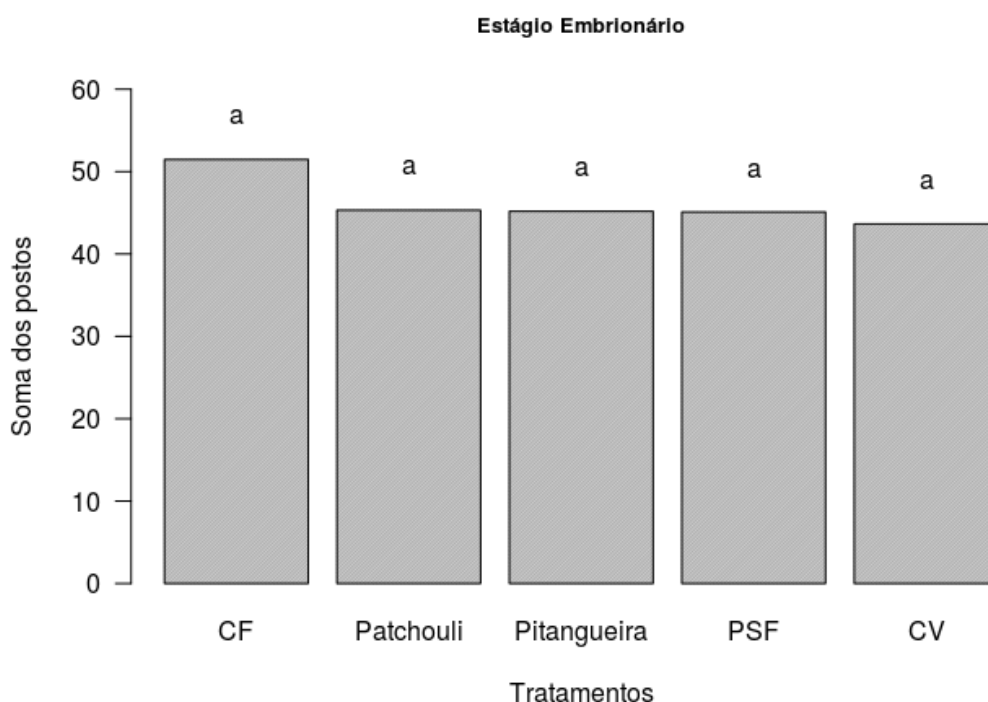
Tabela 2 – Distribuição dos embriões de *Gallus gallus domesticus* em cada estágio embrionário por tratamento, incubados por 72 horas, a 38 °C, com umidade e ventilação constantes.

Tratamentos	Estágio				
	15	16	17	18	19
Controle Fechado	0	2	10	7	0
Controle Veículo Tween 80 [®] a 1%	0	4	11	6	1
Fungicida Rovral	0	5	8	3	2
Patchouli	0	2	11	3	0
Pitanga	1	2	8	5	0
Total	1	15	48	24	3

Fonte: Autora (2019).

Yamamoto (2009) analisou os estágios de desenvolvimento embrionário inicial de aves, tratados com concentrações diferentes de cloreto de cádmio. Observou que no período de incubação de 72 horas, o maior número de estágio embrionário foi o estágio 18. Diferindo dos resultados encontrados neste trabalho, onde o maior número de embriões de *G. gallus domesticus* coletados estão classificados no estágio 17. Considerando os dados da Figura 14 não houve atraso ou aceleração do estágio embrionário analisado no tempo E3, ou seja, o terceiro dia embrionário (HOUENOU e OPPENHEIM, 1994; YAGINUMA et al., 2001; Vismara, 2019).

Figura 14 – Estágios de desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* nos tratamentos com óleos essenciais (patchouli e pitangueira), controle fechado, controle veículo (Tween[®] 80 a 1%) e o fungicida Rovral (a base de iprodiona). Teste de Kruskal e Wallis (1952)



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

O presente trabalho fez uso de embriões de ave (*G. gallus domesticus*) como modelo experimental para estudos toxicológicos de OEs (*E. uniflora* e *P. cablin*), sendo comparado também a exposição de um produto fitossanitário sintético a base de iprodiona (Rovral[®] SC). Foram analisadas as porcentagens de viabilidade, sobrevivência, normalidade dos embriões, estágios do desenvolvimento embrionário,

malformações anatômicas encontradas e a frequência cardíaca (bpm) dos embriões. Também foi realizada análise (qualitativa descritiva) morfológica de lâminas permanentes contendo os embriões. Recentemente há um crescimento no número de trabalhos relacionando os efeitos danosos ao desenvolvimento embrionário de vertebrados, por conta do uso de produtos fitossanitários sintéticos ou agentes alternativos de controle na agricultura. Dessa maneira, acompanhando ao escopo das novas pesquisas se faz necessária a realização de investigações que esclareçam a população em relação aos riscos que podem ser ocasionados com o uso destes produtos em organismos alvos ou não-alvos.

Ademais, propõe-se para testes futuros a utilização da técnica de aspersão dos tratamentos controle sobre os ovos. Com isso, visa-se encontrar resultados mais precisos devido à similaridade ao que ocorre em ambiente natural, no qual os ovos estão expostos diretamente. Uma vez que os ovos absorvem por meio da casca os agentes contaminantes que se encontram dispersos no ar.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As melhores condições para incubação dos ovos são aquelas que possibilitam suprir as necessidades do embrião durante o seu desenvolvimento embrionário. Sendo o foco deste trabalho a investigação da embriotoxicologia dos OEs de patchouli e pitangueira, em comparação ao fungicida sintético, conclui-se que estes tratamentos apresentaram efeitos toxicológicos ao desenvolvimento embrionário de *G. gallus domesticus*. Os resultados obtidos não obtiveram diferença estatística significativa. Desta forma, os dados colhidos evidenciam que durante o desenvolvimento embrionário podem ocorrer erros. É importante destacar que as variáveis ovos viáveis/inviáveis, sobrevivência/mortalidade dos embriões e embriões normais/anormais e estágios de desenvolvimento embrionário são pertinentes ao desenvolvimento embrionário, podendo ocorrer em qualquer espécie (CARLSON, 1996).

REFERÊNCIAS

- AGRA, N. G.; SANTOS, R. F. **Agricultura Brasileira: situação atual e perspectivas de desenvolvimento**. Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Recife, PE: Brasil, 2001, 9p.
- ALVES FILHO, José Prado. **Uso de Agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume; Fapesp, 2002. 54p.
- ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini **Efeito do iprodiona (ROVRAL®) EM *Gallus gallus***. 2017. 87 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62 (1): 55 – 61, 2003.
- AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Lat. Am. J. Pharm.** 26(1): 76-81, 2007.
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 341 p., 2009.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M. Óleos Essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, 588-594, 2009.
- BUAINAIN, Antônio Márcio et al. **O mundo rural no Brasil do século 21: a formação de um novo padrão agrário e agrícola**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 1182 p.
- CALDAS, C. A.; PINHO, M. P., ZALUSKI, R. Impacto das principais classes de agrotóxicos utilizadas mundialmente sobre a apicultura. Anais da XI Mostra Científica FAMEZ/UFMS. Campo Grande, 2018. Disponível em: <https://famez.ufms.br/files/2015/09/Carlos-Amancio-Caldas.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2019.
- CAMPANHOLA, Clayton; BETTIOL, Wagner. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2003, 279 p.
- CARLSON, B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996.
- CARNEIRO, Fernando Ferreira et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: UPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARSON, Rachel. **Primavera Silenciosa**. Barcelona: Grijalbo, 1962.

ROSSONI, Claudia Cristina. **Análise toxicológica dos óleos essenciais de Citronela (*Cymbopogon* sp) e Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758)**. 2019, 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

CONCEA. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos** – DBCA. Brasília/DF, 2013.

COSTA, G. A.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; DESCHAMPS, C. Rendimento e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) conforme o tempo de extração. **Rev. Bras. Pl. Med.** Campinas, v. 15, n.3, p.319-324, 2013.

EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 212 p.

FONSECA, Maira Christina Marques et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.45-50, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/140973>>. Acesso em: 07 abr. 2019.

FREITAS, B. M. C.; BOMBARDI, L. M. A política nacional de irrigação e o uso de agrotóxicos no Brasil: Contaminação e intoxicações no Ceará. **GEOgraphia**, vol. 20, n. 43, mai./ago 2018.

GODOY, Rosana Catie Bueno de; OLIVEIRA, Maria Ionária de. **Agrotóxicos no Brasil: Processo de registro, Riscos à Saúde e Programas de Monitoramento**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004.

GREENPEACE. **Agricultura Tóxica: um olhar sobre o modelo agrícola brasileiro**. Campanha de Agricultura e Alimentação do Greenpeace Brasil. 2017.

GROSSAM, L.; ZITUNE, G.; BERTAZZI, L. **Pitanga mágica: a mais brasileira das frutas na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo, SP: Optionline, 2010. 127 p. Disponível em: <http://www.gardencity.com.br/pitanga_magica.php>. Acesso em: 07 nov. 2019.

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

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, v. 50, n. 3, p. 346–363, 2008.

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

JUNG, Paulo Henrique et al. Atividade inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. **Floresta e Ambiente**, 20(2), 191 – 196, abr./jun., 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/floram/v20n2/a06v20n2.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2019

JUNIOR, Caio Prado. **História Econômica do Brasil**. 26 ed. São Paulo: Editora e Livraria Brasiliense, 1976.

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

KMECICK, Melyssa. **Desenvolvimento de defesa antioxidante em embriões de ave *Gallus gallus***. Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba, 2014.

KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A. Use of rank in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, Taylor & Francis, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1952.10483441>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

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.

LIMA, Igara de Oliveira et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(2): 197 – 201, Abr./Jun. 2006.

LEI 7.802 de 11 de Julho de 1989. Disponível em: <[file:///C:/Users/free/Downloads/Lei%207802-1989%20-%20Lei%20dos%20Agrot%C3%B3xicos%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/free/Downloads/Lei%207802-1989%20-%20Lei%20dos%20Agrot%C3%B3xicos%20(1).pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2019.

LORENZETTI, E. R. et al. Biodiversidade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, especial, p. 619-627, 2011. Disponível em: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_11_5/v13_esp_19.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2019.

MATTOS, Liliana Patrícia Vital de. **Controle de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em laranja com óleos essenciais e agentes de biocontrole**. Tese (Doutorado) — Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, 2010. 94 p. Disponível em: <<http://200.145.6.238/handle/11449/106632>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

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

MAZARO, Sérgio Miguel et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, scielo, v. 38, p. 1824 – 1829, out. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n7/a04v38n7.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized linear models. London, UK – New York, USA: Chapman and Hall, 1989. 261 p.

MENDIBURU, F. de. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. [S.l.], 2019. R package version 1.3-1. Disponível em: <<https://CRAN.Rproject.org/package=agricolae>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

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

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

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. M. Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (General)*, Wiley Online Library, v. 135, n. 3, p. 370–384, 1972.

OLIVEIRA, José V.; VENDRAMIM, José D. **Repelência de Óleos Essenciais e Pós Vegetais sobre Adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em Sementes de Feijoeiro**. An. Soc. Entomol. Brasil 28(3), 1999.

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

PATTNAIK, S; SUBRAMANYAM, V.R.; KOLE, C. **Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro**. *Microbios*, v. 86, n. 349, p. 237–246, 1996. ISSN 00262633. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/8893526>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1 (ano 34), p. 27-48, jan./abr. 2010. Editora UFPR. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/economia/article/view/20523/13714>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

PINHEIRO, J. et al. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. [S.l.], 2019. R package version 3.1-140. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PRAIA, J.; GIL-PÉREZ, D.; VILCHES, A. O Papel da Natureza da Ciência na Educação para a Cidadania. **Ciência e Educação**, v. 13, n. 2, p. 141-156, 2007.

Projeto de Lei 6670/2016. Disponível em: <<https://www.chegadeagrotoxicos.org.br/>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

RAMYA H. G.; PALANIMUTHU V.; SINGLA RACHNA. **An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.)** – A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind. Agric Eng Int: CIGR Journal, july, 2013, v. 15, n. 2. Disponível em: <https://www.academia.edu/25578500/An_introduction_to_patchouli_Pogostemon_cablin_Benth._A_medicinal_and_aromatic_plant_Its_importance_to_mankind>. Acesso em: 14 abr. 2019.

RCoreTeam.R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

REIFSCHNEIDER, Francisco José Becker et al. **Novos ângulos da história da agricultura no Brasil**. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 112 p.

SAMINÉZ, T.C.O. et al. Princípios norteadores da produção orgânica de hortaliças. **Circular Técnica 67 EMBRAPA HORTALIÇAS/MAPA**. Brasília, DF, 2008.

SANTANA, V.S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.47, n.3. São Paulo, jun.2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v47n3/0034-8910-rsp-47-03-0598.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SANT'ANA, T. C. P. et al. Influencia do aromatizamento de folhas secas no óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). **Quim. Nova**, v.33, n.6, 1263-1265, 2010.

SANTOS, Adailson da Silva. **Óleos Essenciais: uma abordagem econômica e industrial**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

SANTOS, Alberdan Silva et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico 99**. Belém, PA, 2004.

SANTOS, A. S. et al. **Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species**. Acta Amazonica, v. 28, n. 2, p. 127-130, 1998.

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

SCHNEIDERS, Samoel. **Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná em 2016 e 2017**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. 44 f, 2018.

SERAFINI, Luciana Atti et al. **Extração de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SILVA, I. M. A. Óleo essencial de patchouli no controle da traça-das-crucíferas. **Hortic. bras.**, v.29, n.2, julho 2011. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/EventosX/Trabalhos/EV_5/A4049_T5995_Comp.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2019.

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

SPADOTTO, Claudio A. et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p.

TERRA, Fábio Henrique Bittes. **A Indústria de Agrotóxicos no Brasil**. Dissertação de mestrado em Desenvolvimento Econômico. Curitiba, 2008.

VISMARA, Lilian de Souza. **Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea* in vitro e ação toxicológica**. Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, f. 212, 2019.

WATANABE, C. H. et al. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Ver. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.4, p. 76-86, 2006.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4. Disponível em: <<https://ggplot2.tidyverse.org>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

WICKHAM, H. tidyverse: Easily Install and Load the 'Tidyverse'. [S.l.], 2017. R package version 1.2.1. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=tidyverse>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

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

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

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

ZEILEIS, A.; HOTHORN, T. Diagnostic checking in regression relationships. R News, v. 2, n. 3, p. 7–10, 2002. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>>. Acesso em: 12 nov. 2019.