



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA
VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
BIOCIÊNCIAS**

**EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DO ROVRAL® DURANTE A ORGANOGÊNESE DE
EMBRIÕES DE GALINHA (*Gallus gallus*)**

Beatriz Mitidiero Stachissini Arcain

Foz do Iguaçu
2020

**EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DO ROVRAL® DURANTE A ORGANOGÊNESE DE
EMBRIÕES DE GALINHA (*Gallus gallus*)**

Beatriz Mitidiero Stachissini Arcain

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Gross

Financiamento: Programa de Demanda Social da UNILA

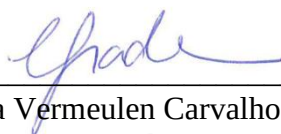
Foz do Iguaçu
2020

BEATRIZ MITIDIERO STACCHISSINI ARCAIN

Efeitos embriotóxicos do Rovral® durante a organogênese de
embriões de galinha (*Gallus gallus*)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências.

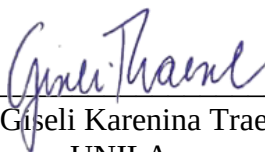
BANCA EXAMINADORA



Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade
Orientadora
UNILA



Dra. Claudia Feijó Ortolani-Machado
UFPR



Dra. Giseli Karenina Traesel
UNILA

Foz do Iguaçu, 10 de abril de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

A668e

Arcaín, Beatriz Mitidiero Stachissini.

Efeitos embriotóxicos do Rovral® durante a organogênese de embriões de galinha (*Gallus gallus*) / Beatriz Mitidiero Stachissini Arcaín. - Foz do Iguaçu, 2020.

190 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Carla Vermeulen Carvalho Grade.

1. Embriologia - aves. 2. Fungicidas - malformações - galinha. 3. Toxicologia - Iprodiona. I. Grade, Carla Vermeulen Carvalho, Orient. II. Título.

CDU: 634.75:598.2

Dedico este trabalho
àqueles que me
acompanham nessa
jornada existencial.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à minha orientadora por todos esses anos, desde a graduação até aqui. Obrigada por toda a dedicação, carinho, paciência, confiança e os puxões de orelha. Eu aprecio muito a pessoa/docente/pesquisadora/orientadora e todas as suas outras faces. Obrigada!

Agradeço à minha coorientadora pela dedicação, paciência, auxílio na metodologia e na prática em laboratório, além da confiança em me deixar utilizá-lo para completar a pesquisa. Também por nos ajudar nessa reta final de defesa.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Amanda, In, Celeste, Vic, May e Sah por estarem presentes, por me auxiliarem, pelas risadas e todo o tempo compartilhado. Por favor, mantenham o armário arrumado...

Agradeço ao André, nosso fornecedor de ovos.

Agradeço aos professores Cleto e Chiba, por auxiliarem nas análises estatísticas.

Gostaria de agradecer imensamente ao Erwin, por administrar os assuntos do mestrado de forma eficiente, por suportar a gente, pela competência e boa vontade em sempre nos ajudar.

Agradeço aos professores e colegas discentes do mestrado por esses dois anos.

Agradeço em especial ao Chris e Açu por essa amizade de dois anos. Vocês fizeram desse mestrado louco um “louco, mas divertido”. Agradeço à Renata também. Pelo companheirismo, os cafés e bolos, o evento de doer a cabeça, os litrões e as risadas. Obrigada Sani, por também compartilhar esses momentos comigo.

Agradeço à Jujuba, por ter me suportado por esses anos e ter sido a melhor companheira de casa que eu poderia ter. Te amo. Agradeço a tia também por aguentar a gente e ter feito gordices.

Agradeço à Sah e Whitney, por compartilhar junto comigo confiança, amizade e perrengues. Amo vocês.

Agradeço à Adri e Angelo do laboratório 009 pelas conversas e risadas de quem não tem mais o que fazer (eu) e ficava invadindo laboratório alheio para jogar conversa fora.

Agradeço à Júlia, Lara, Ciça, Manu, Sara, Mari, Raquel, Giu, outras Marianas, meus antigos companheiros de graduação que tive contato no mestrado, Nath de Biotec, Maria Carolina, Ema, Paty, Jéssica Jeziorny, Júlia, Ágatha, Renata, Marcos, Glenda e demais que eu tenha esquecido.

Agradeço à Carol, Poena, Elmar e Yrlan por me darem estadia para terminar o experimento, em especial as meninas por compartilharem muitos momentos comigo dentro do laboratório.

Agradeço à Gé, Karen e Jan pela amizade de tanto tempo e tenho saudades dos nossos domingos.

Agradeço à Ana, Karol e Tay pelo companheirismo e risadas.

Obrigada à Adri do pilates, por me proporcionar as melhores aulas. Tenho muita saudade das nossas conversas.

Agradeço aos técnicos de laboratório que me auxiliaram durante o mestrado, cuidaram do laboratório e resolveram os perrengues.

Agradeço aos demais técnicos administrativos, pessoal da manutenção e limpeza por fazerem a universidade funcionar. Principalmente a Dona Nita, uma senhora muito amável e trabalhadora que muito prontamente limpava o laboratório.

Agradeço aos demais colegas que tive contato do laboratório 009, de biodiversidade e L17. Agradeço aos professores desses laboratórios que me permitiram trabalhar e terminar a parte experimental.

Agradeço aos meus amigos Cornos sem Falecidos pela amizade e os RPGs. Vou sentir uma saudade imensa.

Agradeço à Denise e ao Miguel pela grande amizade, pelos domingos de visitas, pelas sugestões de jogos, livros, mangás e animes, pelas zoeiras e por estarem ali.

Agradeço ao Césinha, Regi, Lê, Rafa, Grilo, Kalb e todos os outros que tive contato nesses rolês loucos de final de semana.

Agradeço imensamente ao Césinha e sua família por me acolherem tão calorosamente. Amo vocês, espero poder vê-los no futuro.

Agradeço ao Jhon e a família dele por me acolherem com muito amor e carinho também. Amo muito vocês e espero vê-los novamente.

Agradeço aos meus amigos de longa data Fanny, Marcos, Dam e Roberto por estarem longe, mas ainda ao meu lado. Por, apesar da distância, quando conversamos parece que nos vimos ontem.

Agradeço aos meus amigos que conheci por causa do World of Warcraft: Pyerry, Tuy, Moni, irmãos Yama e Santi.

Agradeço à minha segunda família que amo imensamente: Deo, Thy, Cin, Valda e Careca.

Agradeço novamente à Suzana por me doar o melhor gato do infinito inteiro, que é minha melhor companhia.

Agradeço aos meus pais e irmãs, que amo com todo o meu ser, por todo o apoio, confiança, carinho, preocupação, atenção e amor. Ao Rafa pelo carinho. À vovó Tereza e a tia San por toda a atenção extra e o din din que continuou me ajudando. Aos meus tios e primos. Aos avós Carmen e Zé, tio Marcio, tio Kiko, tia Leninha e filhos. Ao meu falecido avô Rada, por ter sido uma das melhores pessoas que passou pela minha vida, por todo amor incalculável que você nos deu, eu sinto a sua falta.

Obrigada à UNILA pela oportunidade, experiência e, principalmente, pela bolsa.

Agradeço àqueles que me fizeram qualquer tipo de dano. Pessoas como vocês fazem com que eu valorizasse ainda mais todas essas outras as quais agradei anteriormente.

Obrigada galinhas que botaram meus ovos, Google, Sci-Hub, Central de Mangás, Anime FLV, Cine Cataratas, Cinemark, Subway, Burguer King, Netflix, aos drives que me salvaram, Microsoft Office, Photoshop, Foxit, restaurante Madera, lanchonete da Unioeste, Cantinho do Sabor, Ítalo Supermercado, Minutô, Pelegrini's Pizzaria, Super Pizza, padaria do Belvedere, Coca-cola, Facebook, Instagram, Whatsapp, Steam, Origin, Nuuvem, Past, Samsung, Tim e demais que não lembro no momento.

Por fim, queria um parágrafo de autoapreciação e agradecer à mim por todo o esforço e dedicação durante esses dois anos, de pesquisar e trabalhar nos laboratórios e ter enfrentado várias adversidades emocionais durante o mestrado. Por ter crescido como pessoa e como acadêmica.

No caso de sua existência, agradeço à Deus por tudo isso.

Aos que não tive muito contato, mas que me proporcionaram boas risadas, meus agradecimentos.

Agradeço aos demais que esqueci e que vocês não tenham um coração peludo.

*O método científico é comprovado e verdadeiro.
Não é perfeito, é apenas o melhor que temos.
Abandoná-lo, junto com seus protocolos céticos,
é o caminho para uma idade das trevas.*

Carl Sagan

ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini. **Efeitos embriotóxicos do Rovral® durante a organogênese de embriões de galinha (*Gallus gallus*)**. 190. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

A grande demanda por produtos alimentícios levou a um aumento na produção agrícola em diversos países e, como consequência, à intensificação no uso de agrotóxicos. Apesar da importância desses químicos para a subsistência da nossa espécie, os agrotóxicos impactam negativamente o ambiente, a biodiversidade, a qualidade do alimento e a saúde animal e humana. O Rovral® é um fungicida usado para o controle de pragas que acometem várias culturas. Pouco se conhece sobre os efeitos do Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário de animais amniotos, incluindo os humanos. Assim, este trabalho teve o objetivo de analisar os efeitos do Rovral® durante a organogênese de galinha a partir do tratamento agudo *in ovo*. Para isso, ovos fertilizados foram inoculados com diferentes concentrações de Rovral® (100, 300, 500 e 750 µL/mL), injetadas na câmara de ar do ovo. Após um período de sete dias de incubação, os ovos foram abertos e os embriões foram analisados quanto à mortalidade, possíveis malformações, estadiamento e peso. Posteriormente, foram realizadas medidas das estruturas do corpo, incluindo cabeça, tronco, membros e olhos para análise de morfometria e assimetria. Foi verificado que os tratamentos com Rovral® afetaram a taxa de mortalidade em relação aos controles de maneira crescente dependente de concentração. A partir dos dados de mortalidade, o valor da LC₅₀ foi estimado em 738 µL/mL. Os tratamentos com Rovral® não afetaram a taxa de malformação em embriões vivos em relação aos controles e entre as concentrações, apesar de terem sido observados diversos tipos de malformações, dentre as quais destacaram-se as hemorrágicas, oculares, cefálicas e no tronco. Os tratamentos com Rovral® não alteraram significativamente o peso, estadiamento, medidas do corpo ou simetria dos embriões vivos. Para as análises sanguíneas, ovos foram tratados com 300 µL/mL de Rovral® (LC₂₅ calculada) e foram feitas análises de glicemia, presença de micronúcleos e anormalidades nucleares dos eritrócitos. Segundo as análises, houve diferença estatística entre os tratados e controles apenas para a anormalidade de eritrócitos binucleados. Através desta pesquisa, foi possível constatar que a LC₅₀ do Rovral® em embriões de galinhas tratados de maneira aguda é de 492 vezes maior que a concentração recomendada para uso, apesar de ter sido verificado aumento da taxa de mortalidade e presença de malformações significativas na menor concentração utilizada neste estudo (67 vezes maior que a recomendada para uso). No entanto, como não houve diferença estatística da taxa de malformação, do peso, estadiamento, medidas do corpo dos embriões vivos e glicemia, pode-se afirmar que os embriões sobreviventes conseguiram se desenvolver normalmente apesar da contaminação. Desta forma pode-se concluir que este fungicida apresenta baixa toxicidade nas condições analisadas. Não obstante, além de algumas malformações, algumas alterações nos núcleos dos eritrócitos foram verificadas, apesar de a quantidade de amostras analisadas ter sido baixa. Adicionalmente, é relevante apontar que os ensaios foram realizados de maneira aguda, e é possível que alterações mais significativas sejam observadas em concentrações mais baixas mediante contaminação crônica. Portanto, é necessária cautela no uso deste fungicida, uma vez que ele possui potencial teratogênico e mutagênico.

Palavras-chave: Embriologia. Fungicida. Iprodiona. Malformações. Toxicologia.

ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini. **Efectos embriotóxicos de Rovral® durante la organogénesis de embriones de pollo (*Gallus gallus*)**. 190. Disertación de maestría del Programa de Postgrado en Biociencias - Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMEN

La gran demanda de productos alimenticios ha provocado un aumento de la producción agrícola en varios países y, como consecuencia, una intensificación en el uso de plaguicidas. A pesar de la importancia de estos químicos para el sustento de nuestra especie, los pesticidas impactan negativamente en el medio ambiente, la biodiversidad, la calidad de los alimentos y la salud humana y animal. Rovral® es un fungicida utilizado para controlar plagas que afectan a varios cultivos. Se sabe poco sobre los efectos de Rovral® en el desarrollo embrionario de animales amniotos, incluidos los humanos. Por tanto, este estudio tuvo como objetivo analizar los efectos de Rovral® durante la organogénesis de pollos a partir del tratamiento agudo in ovo. Para ello, se inocularon huevos fecundados con diferentes concentraciones de Rovral® (100, 300, 500 y 750 $\mu\text{L/mL}$), inyectado en la cámara de aire del huevo. Después de un período de incubación de siete días, se abrieron los huevos y se analizaron los embriones para determinar su mortalidad, posibles malformaciones, estadificación y peso. Posteriormente, se realizaron mediciones de estructuras corporales, incluyendo cabeza, tronco, miembros y ojos para análisis de morfometría y asimetría. Se encontró que los tratamientos con Rovral® afectaron la tasa de mortalidad en relación con los controles de una manera cada vez más dependiente de la concentración. A partir de los datos de mortalidad, el valor de LC_{50} se estimó en 738 $\mu\text{L/mL}$. Los tratamientos con Rovral® no afectaron la tasa de malformaciones en embriones vivos en relación a controles y entre concentraciones, aunque se observaron varios tipos de malformaciones, entre las que destacaron las hemorrágicas, oculares, cefálicas y del tronco. Los tratamientos con Rovral® no cambiaron significativamente el peso, la estadificación, las medidas corporales o la simetría de los embriones vivos. Para el análisis de sangre se trataron huevos con 300 $\mu\text{L/mL}$ de Rovral® (LC_{25} calculado) y se realizaron análisis de glucosa en sangre, presencia de micronúcleos y anomalías nucleares de eritrocitos. Según los análisis, hubo una diferencia estadística entre los tratados y los controles solo por la anomalía de los eritrocitos binucleados. A través de esta investigación se pudo comprobar que la LC_{50} de Rovral® en embriones de pollos tratados de forma aguda es 492 veces superior a la concentración recomendada para su uso, a pesar de un aumento en la tasa de mortalidad y la presencia de malformaciones significativas en los más pequeños. concentración utilizada en este estudio (67 veces superior a la recomendada para su uso). Sin embargo, como no hubo diferencias estadísticas en la tasa de malformación, el peso, la estadificación, las mediciones corporales de los embriones vivos y la glucosa en sangre, se puede decir que los embriones supervivientes lograron desarrollarse normalmente a pesar de la contaminación. Así, se puede concluir que este fungicida tiene baja toxicidad en las condiciones analizadas. Sin embargo, además de algunas malformaciones, se verificaron algunos cambios en los núcleos eritrocitarios, aunque el número de muestras analizadas fue bajo. Adicionalmente, es relevante señalar que las pruebas se realizaron de manera aguda, y es posible que se observen cambios más significativos a menores concentraciones por contaminación crónica. Por lo tanto, se necesita precaución en el uso de este fungicida, ya que tiene potencial teratogénico y mutagénico.

Palabras clave: Embriología. Fungicida. Iprodiona. Malformaciones. Toxicología.

ARCAIN, Beatriz Mitidiero Stachissini. **Embryotoxic effects of Rovral® during the organogenesis of chicken (*Gallus gallus*) embryos**. 190. Master's thesis of the Graduate Program in Biosciences - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

The great demand for food products has led to an increase in agricultural production in several countries and, as a consequence, an intensification in the use of pesticides. Despite the importance of these chemicals for the livelihood of our species, pesticides negatively impact the environment, biodiversity, food quality and animal and human health. Rovral® is a fungicide used to control pests that affect various crops and little is known about its effects on the embryonic development of amniotes, including humans. Thus, this study aimed to analyze the effects of Rovral® during chicken organogenesis using acute in ovo treatment. For this, fertilized eggs were inoculated with different concentrations of Rovral® (100, 300, 500 and 750 µL/mL), injected into the egg's air chamber. After a seven-day incubation period, the eggs were opened and the embryos were analyzed for mortality, possible malformations, staging and weight. Subsequently, measurements of body structures were performed, including head, trunk, limbs and eyes for analysis of morphometry and asymmetry. It was found that treatments with Rovral® affected the mortality rate in relation to controls in an increasingly concentration-dependent manner. From the mortality data, the LC₅₀ value was estimated at 738 µL/mL. Treatments with Rovral® did not affect the malformation rate in living embryos in relation to controls and between concentrations, although several types of malformations were observed, among which the hemorrhagic, ocular, cephalic and trunk ones stood out. The treatments with Rovral® did not significantly change the weight, staging, body measurements or symmetry of the living embryos. For blood analysis, eggs were treated with 300 µL/mL of Rovral® (calculated LC₂₅) and analyzes of blood glucose, presence of micronuclei and nuclear abnormalities of erythrocytes were performed. According to the analyzes, there was a statistical difference between the treated and controls only for the abnormality of binucleated erythrocytes. Through this research, it was possible to verify that the LC₅₀ of Rovral® in embryos of chickens treated in an acute manner is 492 times higher than the recommended concentration for use, despite an increase in the mortality rate and the presence of significant malformations in the smallest concentration used in this study (67 times higher than recommended for use). However, as there was no statistical difference in the malformation rate, weight, staging, body measurements and blood glucose of living embryos, it can be said that surviving embryos managed to develop normally despite contamination. Thus, it can be concluded that this fungicide has low toxicity under the conditions analyzed. However, in addition to several malformations, some changes in the erythrocyte nuclei were verified, although the number of samples analyzed was low. Additionally, it is relevant to point out that the tests were performed in an acute manner, and it is possible that more significant changes are observed at lower concentrations through chronic contamination. Therefore, caution is needed in the use of this fungicide, since it presents teratogenic and mutagenic potential.

Keywords: Embryology. Fungicide. Iprodione. Malformations. Toxicology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D - ácido diclorofenoxiacético

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

ABIFINA - Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades

AChE - acetilcolinesterase

ADAM17 - *a disintegrin and metalloproteinase 17*

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

AF - arco faríngeo

ALP - *alkaline-phosphatase*/fosfatase alcalina

ANOVA - análise de variância

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BD - *bud*

BL - bilobado

BMP - *bone morphogenic proteins*/proteína morfogenética óssea

BN - binucleado

C - controle

Ca - cabeça

CAT - catalase

CCOHS - *Canadian Centre for Occupational Health and Safety*/ Centro Canadense de Saúde e Segurança Ocupacional

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

ChE - colinesterase

CO - cálice óptico

cpn - cartilagem pré-nasal

Crh - *corticotropin releasing hormone*/hormônio liberador de corticotropina

Cxcl - *chemokine (c-x-c motif) ligand*/ligante de quimiocina (motivo C – X – C)

Cyp19a - *cytochrome P450 family 19 subfamily A*/citocromo P450 família 19 subfamília A

CYP1A1 - *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*/citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1

DDT - diclorodifeniltricloroetano

Dkk - *Dickkopf-related protein*/proteína relacionada ao Dickkopf 3

dL - decilitro

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

EPA - *Environmental Protection Agency*

Era - *estrogen receptor alpha*/receptor de estrogênio alfa

Etv - *E-twenty six-variant*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*/Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FGF - *fibroblast growth factor*/fator de crescimento de fibroblastos

fn - frontonasal

g - grama

GSH - *reduced glutathione*/glutathiona reduzida

ha - hectare

hCG - *human chorionic gonadotropin*/gonadotrofina coriônica humana

HH - Hamburger e Hamilton

ICGSC - *International Chicken Genome Sequencing Consortium*/Consórcio Internacional de Sequenciamento de Genoma da Galinha

IL - *interleukin*/interleucina

kg - quilograma

KW - Kruskal-Wallis

L - litro

LB - lobado

LC - *lethal concentration*/concentração letal

LD - *lethal dose*/dose letal

LDH - *lactate dehydrogenase*/lactato desidrogenase

LP - lente prospectiva

M - morto

MAP - *mitogen activated protein*/proteína ativada por mitogênio

MCPA - ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético

MDA - malondialdeído

mg - miligrama

MI - membro inferior

MI US\$ - milhões de dólares

Mitf - *microphthalmia-associated transcription factor*/ fator de transcrição associado à microftalmia

mL - mililitro

mM - milimolar

mm - milímetro

mn - mandibular

MN - micronúcleo

MS - membro superior

mx - maxilar

n - nasal

NHGRI - *National Human Genome Research Institute*/Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano

nl - nasal lateral

NOAEL - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis

NOEL - Nível Sem Efeito Observável

Nog - *Noggin*

NT - *notched*

O - olho

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*/ Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Panamericana da Saúde

Pax - *paired box gene*

PBS - *phosphate-buffered saline*/tampão fosfato-salino

PCP - polaridade celular planar

PFOA - ácido perfluorooctanóico

PL - placóide da lente

pmx - osso pré-maxilar

R - réplica

r - rombômero

R² - coeficiente de determinação

RN - retina neural

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

ROS - *reactive oxygen species*/espécies reativas de oxigênio

RPP - retina pigmentada prospectiva

S/T - sem tratamento

Shh - *sonic hedgehog*

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SISAGUA - Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

SOD - superóxido dismutase

t - teste t pareado

T - tratado

TGFβ_{IIr} - *transforming growth factor β type II receptor*

Tnf - *tumor necrosis factor*/fator de necrose tumoral

ton - tonelada

Tr - tronco

TRα - *thyroid hormone receptor alpha*/receptor alfa do hormônio tireoidiano

TRβ - *thyroid hormone receptor beta*/receptor beta do hormônio tireoidiano

Tsh - *thyroid stimulating hormone*/hormônio estimulador da tireoide

UNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Americana

V - vivo

VEGF-A - *vascular endothelial growth factor A*/fator de crescimento endotelial vascular A

VL - vesícula da lente

VO - vesícula óptica

Vsx - *visual system homeobox*

Wilc - Wilcoxon

Wnt - *wingless-related integration site*

ZEF - zona ectodérmica frontonasal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	O USO DE AGROTÓXICOS.....	20
1.2	IMPACTO DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE	21
1.3	FUNGICIDAS E OS EFEITOS ADVERSOS NA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE ORGANISMOS VIVOS	25
1.3.1	Estudos com invertebrados.....	25
1.3.2	Estudos com vertebrados	26
1.3.2.1	<i>Peixes e Anfíbios</i>	26
1.3.2.2	<i>Aves e Mamíferos</i>	28
1.3.2.3	<i>Seres humanos</i>	28
1.4	ROVRAL®	29
1.4.1	Efeitos do Rovral® sobre os seres vivos	30
1.4.2	Efeitos do Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário	32
1.5	USO DE EMBRIÕES DE AVE COMO MODELO PARA ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE	33
1.6	JUSTIFICATIVA	35
2	OBJETIVOS	36
2.1	GERAL	36
2.2	ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	AQUISIÇÃO, PREPARO E INJEÇÃO DOS OVOS	37
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL	39
3.2.1	Influência do controle nos ovos.....	39
3.2.2	Concentração letal média (LC ₅₀) aguda do Rovral® e efeitos morfológicos.....	39
3.2.3	Análises sanguíneas.....	41
3.3	COLETA E ANÁLISE DOS EMBRIÕES	41
3.3.1	Coleta e fixação	41
3.3.1.1	<i>Mortalidade</i>	42
3.3.1.2	<i>Malformações</i>	44
3.3.1.3	<i>Estadiamento e pesagem</i>	44
3.4	ANÁLISES MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	45
3.5	ANÁLISES SANGUÍNEAS.....	46
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4	RESULTADOS.....	52
4.1	CONTROLE X SEM TRATAMENTO	52

4.2	TRATAMENTO AGUDO	53
4.2.1	Encontrando a LC ₅₀	53
4.2.2	Análise morfológica	56
4.2.2.1	<i>Análise de malformações</i>	56
4.2.2.2	<i>Análise dos estágios de desenvolvimento e peso dos embriões vivos</i>	61
4.2.3	Análise morfométrica dos embriões vivos	64
4.2.3.1	<i>Análise das medidas dos embriões</i>	64
4.2.3.2	<i>Análise da assimetria entre lados direito e esquerdo dos embriões vivos</i>	68
4.2.4	Análises sanguíneas	71
4.2.4.1	<i>Análise da glicemia</i>	71
4.2.4.2	<i>Análise de anormalidades nucleares dos eritrócitos</i>	72
5	DISCUSSÃO	74
5.1	CONTROLE NEGATIVO	75
5.2	TRATAMENTO AGUDO	75
5.3	LC ₅₀ DO FUNGICIDA ROVRAL® PARA EMBRIÕES DE GALINHA	76
5.4	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	78
5.4.1	Análise de malformações ocasionadas pelo Rovral® em embriões de galinha	78
5.4.1.1	<i>Malformações craniais</i>	79
5.4.1.2	<i>Malformações oculares</i>	84
5.4.1.3	<i>Malformações no tronco</i>	85
5.4.1.4	<i>Hemorragias</i>	86
5.4.1.5	<i>Malformações caudais</i>	89
5.4.2	Alterações no estadiamento e peso	89
5.5	ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS	91
5.5.1	Estudo de alterações nas medidas de estruturas do corpo	91
5.5.2	Estudo de alterações na simetria bilateral de estruturas do corpo	91
5.6	ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS	92
5.6.1	Glicemia	92
5.6.2	Anormalidades nucleares dos eritrócitos	93
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICE A - TABELAS	122
	APÊNDICE B - GRÁFICOS	189
	ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA	190

1 INTRODUÇÃO

1.1 O USO DE AGROTÓXICOS

A grande demanda por produtos alimentícios (humanos ou animais), consequente do crescimento populacional e mudanças nos padrões de consumo, levou os países a intensificarem a produção agrícola (FAO, 2010). Segundo o Ministério do Meio Ambiente, a Revolução Verde nos anos 1950 marcou o início do uso extensivo de agrotóxicos, com o intuito de melhorar a produtividade e proteção contra pragas na agricultura. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura define os pesticidas (ou agrotóxicos) como:

Qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas ou animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causando prejuízos durante ou interferindo na produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos de madeira ou alimentos para animais, ou substâncias que possam ser administradas a animais para o controle de insetos, aracnídeos ou outras pragas dentro ou sobre seus corpos. O termo inclui substâncias destinadas ao uso como regulador de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes ou agentes para desbaste de frutas ou para impedir a queda prematura de frutas e substâncias aplicadas às culturas antes ou depois da colheita para proteger a mercadoria da deterioração durante o armazenamento e o transporte (FAO, 2003).

Estes produtos são registrados quanto a comercialização, distribuição, uso e descarte pelas agências governamentais responsáveis de cada país, que possuem sua própria regulamentação. Devido a essas regulamentações distintas, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), em conjunto com a Organização Mundial da Saúde (OMS) forneceram orientações para a regulamentação de agrotóxicos através do Código de Conduta Internacional sobre Distribuição e Uso de Pesticidas (FAO, 2010).

No Brasil, a utilização de agrotóxicos teve como finalidade inicial o controle sanitário de vetores e parasitas. Posteriormente, a partir da década de 1960, foram utilizados para melhorar a agricultura (OPAS/OMS, 1996). No país, os agrotóxicos e afins são definidos pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 1989).

Desta definição excluem-se os fertilizantes e produtos químicos administrados a animais para estimular o crescimento ou modificar o comportamento reprodutivo (ABIFINA, 2020).

No ano de 2017, o uso mundial de agrotóxicos pelo setor agrícola somou a quantidade de 4.113.591,25 toneladas (ton) (FAOSTAT, 2019a). A Ásia representa o continente que mais utilizou agrotóxicos (2.159.990,01 ton), seguido das Américas (1.308.006,38 ton), Europa (476.138,24 ton), África (79.787,21 ton) e Oceania (69.699,4 ton). Dos dados mundiais, o país que mais utilizou agrotóxicos foi a China, com 1.763.000 ton, seguido dos Estados Unidos com 407.779,2 ton e o Brasil, com 377.176 ton (FAOSTAT, 2019a).

Apesar da importância desses químicos para a subsistência da nossa espécie, os agrotóxicos impactam negativamente o ambiente, a biodiversidade, a qualidade do alimento e a saúde animal e humana. Uma vez que diferentes produtos químicos causam diferentes efeitos sobre os organismos vivos (Hashimi et al., 2020), a comparação dos níveis de toxicidade é difícil de ser realizada. Portanto, uma maneira de comparar a potência ou intensidade tóxica de diferentes produtos químicos é realizando o teste de letalidade, através da análise da quantidade de um produto químico necessária para causar a morte. Em 1927, o farmacologista John William Trevan desenvolveu o teste de dose letal média (LD₅₀, na sigla em inglês), onde busca-se a dose de determinado composto capaz de matar metade de uma população animal (Saganuwan, 2017). Este índice serve como indicador da toxicidade de uma substância, de forma que quanto maior a dose letal, menos tóxica ela é considerada (CCOHS, 2018).

1.2 IMPACTO DOS AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE

O crescimento populacional e a expansão tecnológica têm levado o homem a modificar drasticamente seu ambiente, alterando todo o ecossistema e causando efeitos como a perda de espécies, aumento de gases na atmosfera e contaminação de solos e corpos d'água. Essas mudanças vêm ocorrendo com mais frequência e, em alguns casos, de forma acelerada (Vitousek et al., 1997).

A contaminação do solo pode afetar os organismos que nele vivem, bem como outros seres vivos que destes se alimentam (Tu et al., 2011). Diversos autores já relataram contaminações do solo, por vários tipos de agrotóxicos, em diversos países diferentes

(Falandysz et al., 2001; Kim & Smith, 2001; Miglioranza et al., 2003; Negoita et al., 2003; Daly et al., 2007; Gonzalez et al., 2010; Anwar et al., 2012; Mishra et al., 2012; Zhang et al., 2018; Gereslassie et al., 2019; Silva et al., 2019), incluindo o Brasil (Rissato et al., 2006; Fan et al., 2018).

De todos os estados brasileiros, 54% não possuem investigação da concentração de pesticidas no solo. Do total de amostras investigadas por cada estado (Figura 1), São Paulo é o estado em que foi realizado o maior número de investigações, tendo sido encontrado o maior número de amostras positivas, seguido do Rio de Janeiro, sendo os principais grupos químicos os organoclorados, triazóis, triazinas, pirazóis, organofosforados, entre outros. As maiores concentrações de pesticidas foram encontradas nos estados do Pará (entre 0.006 e 1243.68 mg/kg), Rio de Janeiro (entre 0.0006 e 397.0 mg/kg) e Paraná (entre 0.20– 4.16 mg/kg) (Fernandes et al., 2020).

Além do solo, a agricultura intensiva gera enormes quantidades de agrotóxicos que atingem os corpos d'água, alterando sua qualidade (Budd et al., 2015; Etchegoyen et al., 2017), e afetando as populações e saúde de organismos aquáticos (Boone et al., 2001; Di Marzio et al., 2010; Gustafsson et al., 2010; Bonansea et al., 2013; Hayasaka et al., 2012; Van Dijk et al., 2013; Mahboob et al., 2015; Yamamuro et al., 2019), causando grande desbalanço em todo o ecossistema.

O esforço conjunto da Repórter Brasil, a Agência Pública e a organização suíça *Public Eye* disponibilizaram informações mais acessíveis sobre a presença de agrotóxicos em águas brasileiras, assim como um mapa interativo sobre quais pesticidas foram encontrados nas redes de abastecimento (Figura 2). Segundo a pesquisa, entre o período de 2014 e 2017 foram testados 1396 municípios para a detecção obrigatória de 27 agrotóxicos. Em uma a cada quatro cidades, foram encontrados diferentes agrotóxicos sendo 16 altamente tóxicos e 11 associados com problemas de saúde, como câncer, malformação fetal, disfunções hormonais e reprodutivas. Ainda, análises detectaram presença de agrotóxicos em 75% dos testes realizados nos municípios testados em 2014, aumentando para 92% em 2017 (Aranha & Rocha, 2019).

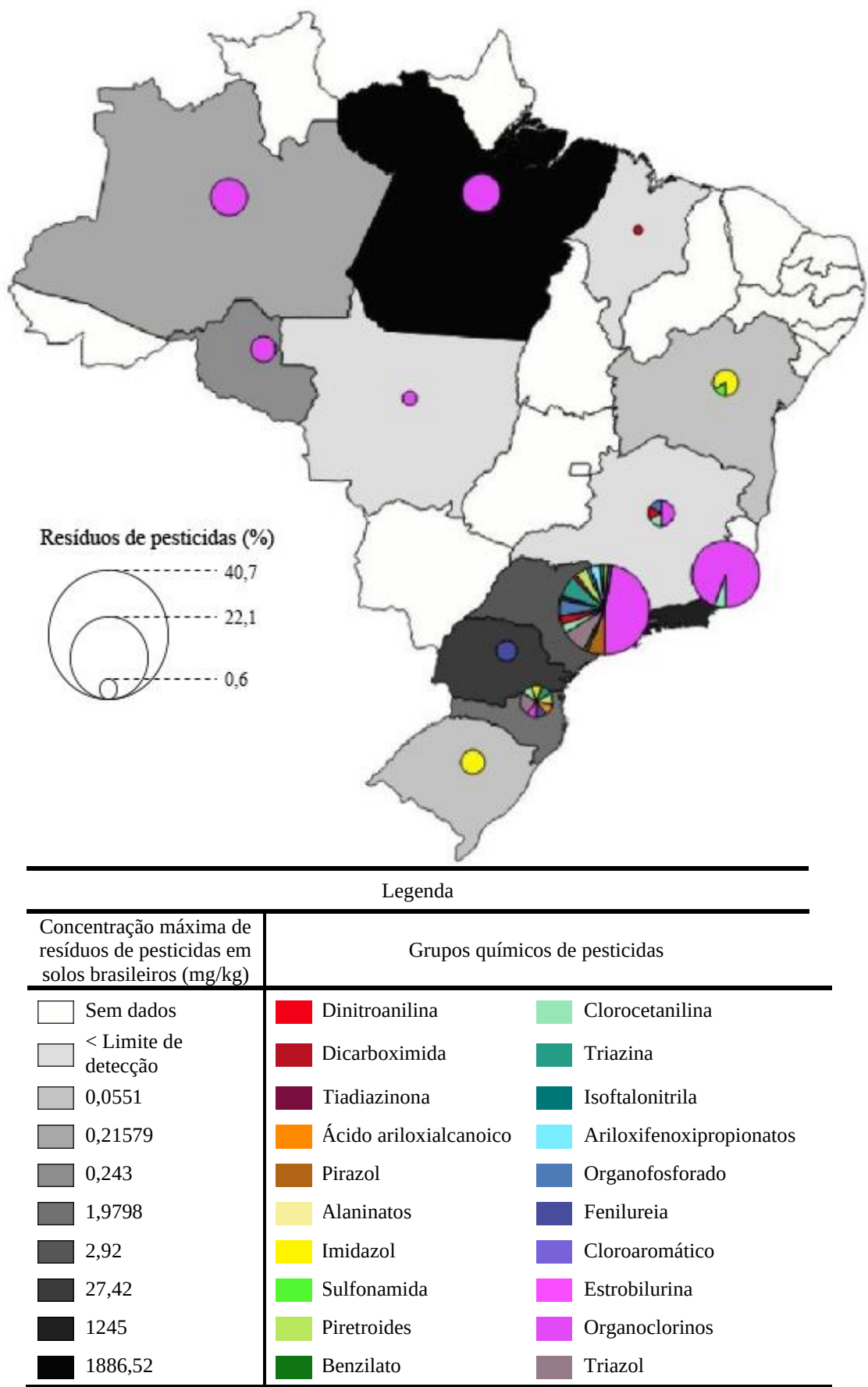


Figura 1. Mapa de pesticidas (resíduos, porcentagem de resíduos e grupos químicos) encontrados no solo por estados brasileiros (adaptado). **Fonte:** Fernandes et al., 2020.

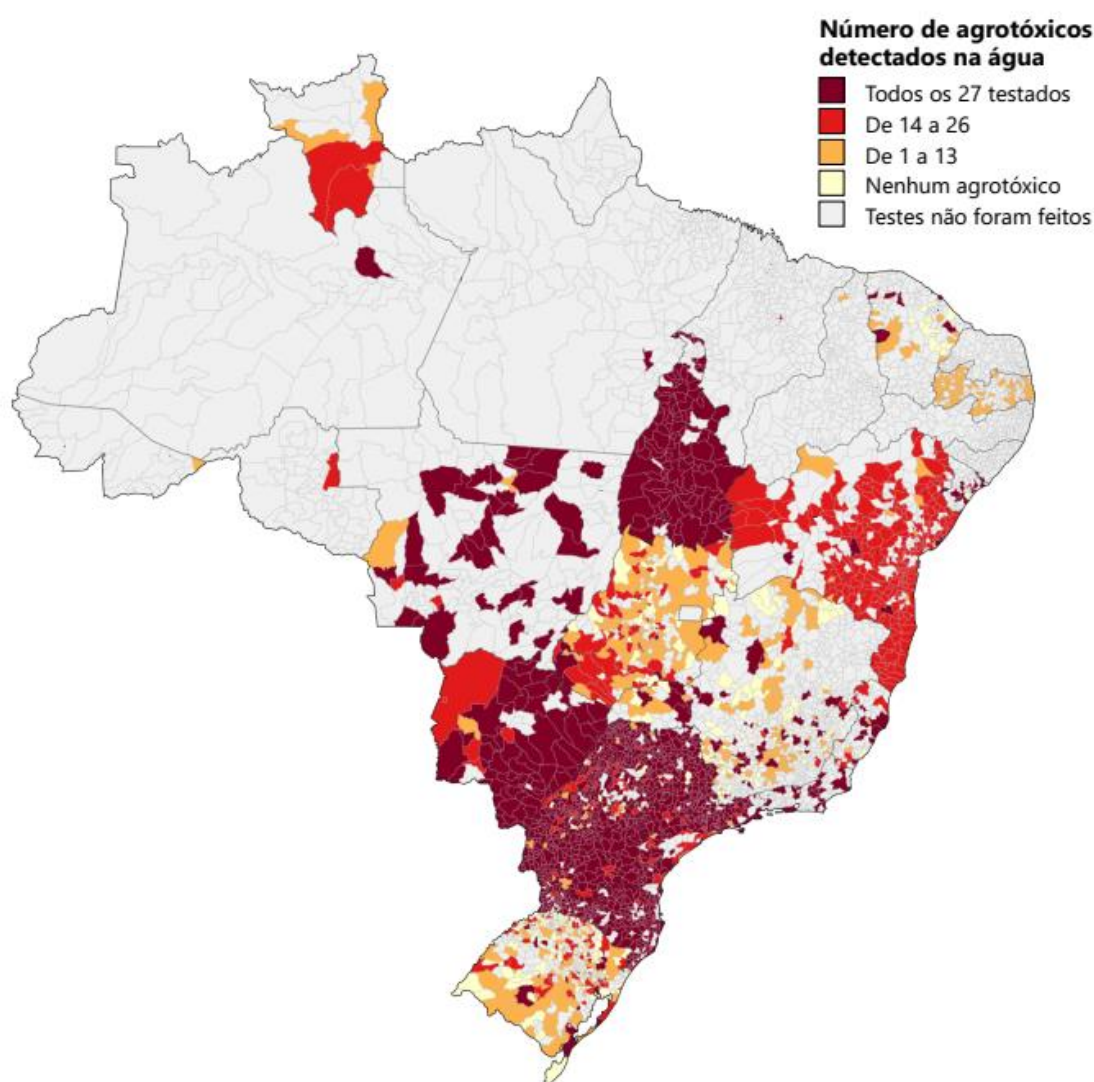


Figura 2. Mapa com números de agrotóxicos encontrados na água. **Fonte:** Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA) – 2014-2017.

Até mesmo organismos que não vivem diretamente no solo ou na água podem ser afetados pela contaminação destes ambientes com agrotóxicos. Já foi demonstrado que espécies não-alvo de fungos (Wilson et al., 2014), insetos (Rundlöf et al., 2015) e até mesmo aves (Hallmann et al., 2014; Angelova, 2016; Mateo et al., 2016; Millot et al., 2017; Van Oosten et al., 2019) podem sofrer os impactos das contaminações ambientais por agrotóxicos, indicando que cadeias tróficas podem ser inteiramente afetadas, o que pode levar a problemas na reprodução e no desenvolvimento embrionário de diversos organismos, afetando o equilíbrio de toda a comunidade, podendo chegar a afetar os seres humanos. Além disso, o uso dos pesticidas influencia na prevalência de parasitas, aumentando a transmissão de doenças (Evans et al., 2018).

1.3 FUNGICIDAS E OS EFEITOS ADVERSOS NA REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE ORGANISMOS VIVOS

Diversos organismos fitopatogênicos causam danos aos cultivos, como os fungos. No entanto, considerando a diversidade de fungos, apenas uma pequena parcela desses organismos pode causar doenças aos cultivos (ADAPAR, 2020).

Os fungicidas são utilizados na indústria, agricultura, nos domicílios e jardins por diversos motivos, como a proteção de sementes, plântulas, flores, frutos e cultivos, controle de bolor e proteção de carpetes e tecidos (EPA, 2013). No Brasil, os fungicidas foram empregados em 18% das áreas tratadas, correspondendo a um volume de 188.721,3 ton de produto aplicado, o que representa 31% do valor total empregado em agrotóxicos (4.370,69 MI US\$), no ano de 2019 (SINDIVEG, 2020).

Os fungicidas têm uma ampla variação de potenciais efeitos na saúde humana e animal, podendo causar problemas como irritação cutânea, ocular e respiratória, alergias, fraqueza, tontura, tremores, dores de cabeça, torácica e abdominal, dispneia, tosse, náusea, vômito, diarreia, perda de tônus muscular, convulsões, danos aos órgãos, mudanças fisiológicas, comportamentais e neurológicas (EPA, 2013). Adicionalmente, diversos estudos reportam os efeitos da contaminação por fungicidas sobre a reprodução e desenvolvimento embrionário de diversas espécies, conforme será discutido abaixo.

1.3.1 Estudos com invertebrados

Diversos estudos realizados em laboratório têm buscado entender os efeitos que os fungicidas desempenham diretamente sobre a reprodução e desenvolvimento de diferentes espécies de animais. Os invertebrados, por exemplo, são um grupo com alta sensibilidade a produtos tóxicos utilizados no meio ambiente, o que pode variar conforme o estágio de vida e características do ambiente em que vivem (como temperatura e pH). Essa sensibilidade se deve a sua capacidade perceptiva para alterações ambientais e também a sua fisiologia (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Rico & Van Den Brink, 2015; González-Alcaraz, 2020). Assim, pesquisas com esses indivíduos são úteis para investigar a toxicidade desses produtos, através do aumento da mortalidade e alterações na reprodução.

Contaminações por fungicidas causaram aumento na mortalidade de diversos grupos de invertebrados, como crustáceos (Zubrod et al., 2014; Silva et al., 2015; Liu et al.,

2018), oligoquetas (Huan et al., 2016; Rico et al., 2016), vespas (Heneberg et al., 2019) e abelhas (Wade et al., 2019). Além disso, diversas alterações na reprodução causadas por fungicidas já foram reportadas, incluindo alterações no tempo de pupa e metamorfose em adultos de *Pemphredon fabricii* (Heneberg et al., 2019), diminuição do tamanho corporal e da frequência de mudas, bem como inibição da reprodução e danos no DNA de *Daphnia magna* (Silva et al., 2015; Liu et al., 2018), redução nas taxas de reprodução de *Eisenia andrei* (Alves et al., 2013), mudanças morfológicas, inibição da atividade da colinesterase (ChE), da lactato desidrogenase (LDH) e da fosfatase alcalina (ALP), danos histopatológicos e no DNA de *Eisenia foetida* (Huan et al., 2016; Rico et al., 2016).

1.3.2 Estudos com vertebrados

No meio ambiente, os animais vertebrados também estão expostos à água, solo e ar contaminados por fungicidas, além de alimentos, muitas vezes na forma de invertebrados. Vários estudos relatam os efeitos de fungicidas sobre o desenvolvimento embrionário em diversas espécies, que vão desde malformações à alterações metabólicas, genéticas, sanguíneas e comportamentais, conforme descrito a seguir.

1.3.2.1 Peixes e Anfíbios

Os peixes são animais altamente suscetíveis à presença de agrotóxicos na água, uma vez que todo o seu ciclo de vida acontece neste ambiente (Ibrahim et al., 2013) e o contato com agrotóxicos ocorre por toda sua superfície corporal (Kane et al., 2005). Por isso, esses organismos são amplamente utilizados em estudos que buscam compreender os impactos ocasionados nas populações quando o ambiente está contaminado com agrotóxicos.

Um aumento na mortalidade foi observado em embriões de diversas espécies de peixes submetidos a tratamento com fungicidas (Van Boxtel et al., 2010; Ludwikowska et al., 2013; Palanikumar et al., 2014; Chu et al., 2016; Mohammadalikhani et al., 2017; De La Paz et al., 2017; Liu et al., 2018; Cao et al., 2019a; Cao et al., 2019b; Souders II et al., 2019). Outros efeitos observados incluíram diminuição da taxa de eclosão, malformações, diminuição dos batimentos cardíacos, da atividade locomotora e da bioenergética mitocondrial (De La Paz et al., 2017; Cao et al., 2019b; Souders II et al., 2019), alteração nas atividades locomotoras e comportamentais de *Danio rerio* (Van Boxtel et al., 2010; Cao et al., 2019a), redução no

número e viabilidade de ovos, redução na taxa de eclosão e desregulação da homeostase hormonal para reprodução de *Oryzias latipes* (Chu et al., 2016; Liu et al., 2018), redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *Chanos chanos* (Palanikumar et al., 2014), alterações nos parâmetros sanguíneos e influxo/efluxo de água e íons nas brânquias em *Cyprinus carpio* (Saravanan et al., 2015), danos nas brânquias e no fígado, e alterações nos parâmetros sanguíneos de *Ctenopharyngodon idella* (Mohammadalikhani et al., 2017), danos no DNA e nos cromossomos em *Anguilla anguilla* e *Chanos chanos* (Palanikumar et al., 2014; Marques et al., 2016).

Os anfíbios também dependem do ambiente aquático para sua reprodução, e os seus ovos e larvas (girinos) são depositados e se desenvolvem inteiramente dentro deste ambiente, passando pelo processo de metamorfose, o que os torna muito suscetíveis a alterações que podem impactar a sobrevivência na fase adulta (Van Meter et al., 2014), principalmente quando associado a presença de um predador (Relyea, 2005). A pele dos anfíbios possui uma alta permeabilidade devido a função na respiração e regulação interna de água e íons (Uchiyama & Konno, 2006). Por esse motivo, a pele dos anfíbios facilita a penetração de compostos químicos (Quaranta et al., 2009), deixando esses animais ainda mais frágeis para lidar com ambientes contaminados.

Diversos estudos têm demonstrado os graves efeitos de fungicidas para os anfíbios, causando aumento nas taxas de mortalidade de embriões e girinos de diversas espécies (Shenoy et al., 2009; Belden et al., 2010; Hooser et al., 2012; Yu et al., 2013; Bernabò et al., 2016; Cusaac et al., 2016; Gürkan & Hayrettaş, 2015; Li et al., 2016; Svartz et al., 2016a; Svartz et al., 2016b; Wu et al., 2018; Acquaroni et al., 2020; Bernabò et al., 2020). Adicionalmente, a contaminação por este tipo de agrotóxico levou à inibição do crescimento e aumento na porcentagem de malformações em embriões de *Xenopus tropicalis* e *X. laevis* (Yu et al., 2013; Li et al., 2016; Wu et al., 2018), redução da taxa de crescimento em *Rana pipiens* (Shenoy et al., 2009), malformações em *Bufo bufo* e *Pseudepidalea viridis* (Gürkan & Hayrettaş, 2015), aumento da massa corporal, redução nas taxas de desenvolvimento, atraso e redução do sucesso na metamorfose e malformações em *Hyla intermedia* (Bernabò et al., 2016; Bernabò et al., 2020), atrasos no desenvolvimento, malformações e alterações comportamentais em *Rhinella arenarum*, bem como malformações em *Spea multiplicata* (Yu et al., 2013; Svartz et al., 2016a; Svartz et al., 2016b; Acquaroni et al., 2020).

1.3.2.2 Aves e Mamíferos

As aves são organismos considerados sensíveis à exposição de químicos, por apresentarem baixos níveis de enzimas detoxificantes e hábitos alimentares específicos (Grue & Shipley, 1984; Parker & Goldstein, 2000). Apesar disso, estudos utilizando esses organismos e buscando compreender os efeitos de agrotóxicos sobre sua saúde não são muito comuns. A contaminação aos embriões de aves pode vir tanto diretamente quando em contato com o ovo, como indiretamente através de contaminação materna ou paterna.

Alguns estudos já relataram os efeitos tóxicos de fungicidas sobre a sobrevivência de algumas espécies de aves, bem como redução na taxa de fertilização, no tamanho e na espessura das cascas dos ovos, diminuição da sobrevivência e da condição corporal dos filhotes (Lopez-Antia et al., 2013; Lopez-Antia et al., 2015; Lopez-Antia et al., 2018). Nestes, intoxicação alimentar por fungicida causou alterações sanguíneas e hepáticas (Shafi et al., 2016; Kong et al., 2020), e em adultos levou a modificações endócrinas (Pandey & Mohanty, 2015) e na função reprodutiva dos machos (Aire, 2005; Grote et al., 2008; Amel et al., 2016; Slimani et al., 2018).

Por outro lado, estudos que visam analisar os efeitos de agrotóxicos sobre o desenvolvimento de mamíferos são inúmeros, devido ao interesse em entender de que forma os seres humanos podem ser afetados por esses químicos. Durante o desenvolvimento embrionário, xenobióticos podem ser transferidos ao feto de mamíferos através da placenta (Myllynen & Vähäkangas, 2013). Alguns estudos conduzidos com fungicidas indicaram efeitos prejudiciais em ratos adultos (Farang et al., 2011; Lehraiki et al., 2011), incluindo danos aos testículos e espermatogênese (Prashantkumar et al., 2012; Sakr & Shalaby, 2014; Adedara et al., 2013; Daundkar & Rampal, 2014) e prejuízo aos embriões/fetos, incluindo perda pós-implantação, morte fetal, diminuição do peso fetal, malformações fetais (Farang et al., 2011), atraso no desenvolvimento do cérebro e tecidos oculares (El-Shershaby et al., 2020).

1.3.2.3 Seres humanos

Os agrotóxicos podem causar danos à saúde humana sob efeitos agudos, em decorrência da exposição a altas concentrações de agentes tóxicos, manifestando sintomas rapidamente, ou ainda sob efeitos crônicos, pela exposição repetida de baixas doses de produtos tóxicos por longos períodos de tempo e com aparecimento de sintomas em meses ou anos

(OPAS/OMS, 1996; BRASIL, 2006). A contaminação humana direta por agrotóxicos ocorre através de três vias principais: a ocupacional, pela manipulação de agrotóxicos, sendo responsável por 80% dos casos de intoxicação; a ambiental, pela contaminação dos recursos naturais utilizados para nossa subsistência; e a alimentar, através da ingestão de produtos contaminados (Moreira et al. 2002).

Alguns estudos epidemiológicos buscaram relacionar a exposição à certos fungicidas e efeitos negativos sobre a saúde humana. Por exemplo, em um estudo de coorte de nascimentos em Bangladesh associados ao uso de biomarcadores, foram encontrados metabólitos de sete pesticidas na urina de mulheres grávidas, sendo um deles o fungicida 4-nitrofenol. As mulheres que apresentaram 4-nitrofenol tiveram um risco aumentado de parto prematuro e as crianças eram pequenas para a idade gestacional (Jaacks et al., 2019). No Paraná, uma pesquisa observou tendência crescente de malformações em nascidos vivos de municípios com maior utilização e exposição de agrotóxicos - alguns deles os fungicidas epoxiconazol/piraclostrobina -, entre 1994 e 2014. A maior parte das malformações incluíram criptorquidia, defeitos no aparelho circulatório e fenda labial e palatina (Dutra & Ferreira, 2017).

Assim, é de extrema relevância para a saúde humana, bem como para a manutenção do meio ambiente, que estudos busquem compreender os efeitos que o uso desses químicos pode causar nos organismos, visando encontrar um equilíbrio entre a necessidade de produção em massa de alimentos e o bem-estar dos seres vivos, incluindo o homem.

1.4 ROVRAL®

O Rovral® é um fungicida não inflamável e não corrosivo, classificado pela Anvisa (2020) como um produto improvável de causar dano agudo (tipo V) e como um produto muito perigoso ao meio ambiente (tipo II). O produto é de formulação pó molhável, grânulos dispersáveis em água e suspensão concentrada, comercializado e registrado em aproximadamente 90 países. Tem como ingrediente ativo 500 g/kg do iprodiona (3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioximidazolidina-1-carboxamida), de fórmula ($C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$) e 500 g/kg de demais ingredientes (não descritos na bula), pertencente ao grupo químico dicarboximida, e pode ser formulado em conjunto com outros fungicidas, como carbendazim, metil tiofanato, difenoconazole ou bromuconazole. É utilizado em culturas de alface, algodão, batata, café, cebola, cenoura, cevada, crisântemo, feijão, morango, pêssego, pimentão, soja,

tomate, trigo e uva com modo de ação por contato. O Rovral® age contra esporos e micélios dos fungos *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci*, *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Dreschlera teres*, *Didymella bryoniae*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Phoma costaricensis*, *Sclerotium cepivorum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. O Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas classifica o iprodiona no Grupo E3, ou seja, estando envolvido no mecanismo de ação MAP (Proteína Ativada por Mitogênio)/Histidina-cinase na transdução do sinal osmótico (FAO, 2006; FMC Agrícola, 2020).

No Brasil, as doses do produto comercial são variáveis e dependem da cultura: 1 kg/100 kg de bulbilhos (alho), 1 kg/1000 covas (café), 0,8 – 1,5 kg/ha (fumo, trigo foliar), 150 g/3200 kg de maçã, 3 kg/4,4 L de água ou 9090 plantas (melão), 200 g/100 kg de semente (trigo) e a dose mais comumente utilizada de 100 g/100 L - 200 g/100 L de água (alface, batata, cebola, cenoura, crisântemo, morango, pêssego, pimentão, tomate, uva) (FMC Agrícola, 2020).

1.4.1 Efeitos do Rovral® sobre os seres vivos

Na bula do Rovral®, são apresentadas as LD₅₀ oral e dérmica para ratos, calculadas em maiores que 2000 mg/kg de peso corporal. De forma crônica, os ratos tratados por via oral e dérmica apresentaram lesão histopatológica no sistema reprodutivo em machos e em glândulas adrenais em machos e fêmeas. Já por via inalatória, houve diminuição da distância ano-genital em filhotes machos. Adicionalmente, o uso na pele de coelhos causou irritação cutânea, opacidade da córnea, inflamação da íris, aumento do fluxo sanguíneo e inchaço na conjuntiva. E, ainda, o tratamento em cães adultos de 2,3 mg/kg/dia durante 1 ano e na dose de 1,5 mg/kg/dia, resultou no aumento de peso do fígado e rins, na diminuição do peso de órgãos reprodutivos e dos indivíduos e danos nas hemoglobinas (FMC Agrícola, 2019; FMC Agrícola, 2020).

Em 2002, a *European Commission* calculou a LD₅₀ oral, dérmica e inalatória para ratos em, respectivamente, maiores que 2000 mg/kg de peso corporal, 2500 mg/kg de peso corporal e 5,16 mg/L ar. Também relatou em sua revisão diversos efeitos negativos à saúde a curto prazo causados pelo iprodiona, como atrofia, hiperplasia e alteração de peso do fígado, adrenais, testículos, ovários, próstatas, rins, hematologia e vesículas seminais em ratos e coelhos, calculando o menor NOAEL (Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis)/NOEL (Nível Sem Efeito Observável) oral relevante para ratos em 3 mg/kg de peso corporal por dia (estudo

de 90 dias), e dérmico relevante para coelhos em 100 mg/kg de peso corporal por dia (estudo de 21 dias). A longo prazo, o tratamento causou em ratos e camundongos danos no fígado, suprarrenais, rins, testículos, ovários, órgãos genitais acessórios, hematopoese extramedular, depósitos anormais de hemoglobina do baço, além de tumores intersticiais de células de Leydig, tumores malignos e benignos de células hepáticas e tumor benigno no ovário. No caso de longo prazo, o menor NOAEL relevante para ratos foi de 6,1 mg/kg de peso corporal (tratamento de dois anos) (European Commission, 2002).

A contaminação por iprodiona também ocasionou estresse oxidativo em culturas de hepatócitos de peixe submetidos a concentrações de 0,2, 0,3 e 0,4 mM de iprodiona em meio de cultura por 24 horas, resultando em aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à indução da isoenzima CYP1A1 (citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídio 1, que participa no metabolismo de metabólitos endógenos e exógenos) e do conteúdo de malondialdeído (MDA), e diminuição do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e atividade da catalase (CAT). Estes resultados indicam o dano oxidativo nas células causado pela exposição ao iprodiona (Radice et al., 2001). Em outro experimento *in vitro*, células humanas da linhagem HEP-2 foram expostas a diferentes concentrações de iprodiona (0, 3,5, 7, 17, 25 e 37 µg/mL). Os tratamentos ocasionaram aumento significativo nas frequências de micronúcleos, dependente da concentração, indicando potencial mutagênico. Ademais, os conteúdos de GSH e superóxido dismutase (SOD) diminuíram, enquanto os níveis de carbonil aumentaram (Chaufan et al., 2019), indicando estresse oxidativo e resposta antioxidante. Adicionalmente, outros estudos foram realizados com iprodiona, demonstrando a inibição da secreção da testosterona *in vitro* e *in vivo*, inibição do transporte de colesterol para a mitocôndria, inibição de atividades enzimáticas, indução do citocromo p450 e proliferação de hepatócitos (European Commission, 2002), além de poder levar à baixa imunidade e também causar alterações no sistema da tireoide (Wang et al., 2018).

Em um estudo realizado através de um simulador de velocidade do vento para pesticidas administrados por aeronaves agrícolas, a exposição ao iprodiona em diferentes concentrações de 5,5 mL, 11 mL, 22 mL e 44 mL, aumentou significativamente a mortalidade de abelhas (Fisher et al., 2017). Quando abelhas operárias foram alimentadas com a dose letal média (LD₅₀) recomendada pelo fabricante (2 mg/kg) do produto iprodiona por 12 e 24 horas, foram registrados aumento na lesão do intestino médio, com aumento de vacúolos citoplásmicos de células digestivas, de maneira dependente do tempo de exposição, além de apoptose celular e necrose celular (caracterizada por núcleos que continham aglomerados de

cromatina condensada, membrana plasmática rompida e extrusão do conteúdo citoplasmático). Apesar da mortalidade não ser significativa, os danos no intestino médio comprometeram a digestão das abelhas, levando a uma absorção ineficiente que pode estar associada com a diminuição da imunidade (Carneiro et al., 2020).

As aplicações repetidas de iprodiona no solo podem afetar a microbiota e levar a impactos negativos na ciclagem de nutrientes e comunidade de bactérias. Enzimas encontradas no solo e envolvidas na ciclagem de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre tiveram redução em sua atividade após exposição a este composto, além de possível acúmulo de seus metabólitos. Simultaneamente, a abundância de bactérias dos filos Chloroflexi e Acidobacteria também declinou, o que pode ter sido responsável pelo declínio da atividade enzimática do solo. Esses filos são responsáveis pela nitrificação e degradação de matéria orgânica, respectivamente (Zhang et al., 2017). De forma semelhante, Verdenelli et al. (2012) também observaram um declínio na atividade e comunidade microbiana em solos tratados com iprodiona.

1.4.2 Efeitos do Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário

Efeitos da contaminação por iprodiona sobre a reprodução já foram detectados em alguns invertebrados. Em *Daphnia magna*, um pequeno crustáceo planctônico, a exposição ao iprodiona reduziu significativamente o tamanho da primeira ninhada em concentrações menores que um quinto da LC₅₀ (concentração letal média) (Matsumoto et al., 2009). Larvas de abelhas operárias (*Apis mellifera*) foram contaminadas com a dose de 0,05 mg/10 g da dieta com o produto Rovral®, e foram monitoradas no estágio larval e pupa. Foi observado um aumento na mortalidade e o desenvolvimento morfológico anormal das pupas, apresentando sistema traqueal amorfofônico (Mussen et al., 2004).

Adicionalmente, foi demonstrado que a contaminação de peixes-zebra nos estágios embrionários, larvais, juvenis e adultos por iprodiona nas concentrações de 0,038, 0,16 e 0,6 mg/L, resultou em alterações na expressão gênica de *P53* (relacionada com apoptose celular), *IL*, *Cxcl*, *Tnf* (relacionadas com o sistema imune), *TRα*, *TRβ*, *ERα*, *Tsh*, *Crh*, *Cyp19a* (relacionadas com o sistema endócrino), indicando que este ingrediente ativo é uma substância potencial causadora de câncer, inflamação, além de imitar os efeitos de estrógenos nos indivíduos, afetando o crescimento e desenvolvimento embrionário. Ademais, tratamentos com 2, 20 e 200 µM de iprodiona aumentaram a maturação de oócitos de peixe-zebra mantidos em

placas com meio de cultura, devido a um aumento de hCG, demonstrando que o ingrediente ativo causa perturbações no sistema reprodutivo de peixes (Maskey et al., 2019).

Ainda na reprodução, tratamentos com iprodiona resultaram em abortos e perda pós-implantação de embriões de coelhos, e perda de peso, atraso no desenvolvimento e alteração na distância ano-genital em filhotes de ratos. Nesses casos, o menor NOAEL relevante na reprodução foi de 17 mg/kg por peso corporal ao dia, e o menor NOAEL/NOEL relevante no desenvolvimento foi de 20 mg/kg de peso corporal ao dia (para ratos e coelhos) (European Commission, 2002). De forma semelhante, ratos *Sprague-Dawley* imaturos submetidos a diferentes doses de iprodiona (50, 100 e 200 mg/kg ao dia) por gavagem apresentaram atrasos significativos no desenvolvimento durante a puberdade, redução nos níveis de testosterona devido a inibição da esteroidogênese, além de significativo aumento do peso corporal (Blystone et al., 2007).

Atualmente, pouco se conhece sobre os riscos do uso do Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados, especialmente os amniotos, incluindo os seres humanos e não há artigos publicados relacionados aos efeitos do Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário de aves. No trabalho de graduação de Rossoni (2019), ovos injetados com 100 µL de solução do produto (concentração de 3 µL de Rovral® em 2 mL de água destilada) no dia 0 (após a postura) apresentaram alta taxa de mortalidade e alguns embriões malformados. No trabalho de conclusão de curso de Arcain (2017) com Rovral®, foi apontada uma possível LC₅₀ de aproximadamente 100 µL/mL, correspondente a 67 vezes a dose recomendada para uso, além de terem sido observadas alterações morfológicas e morfométricas. Entretanto, este trabalho foi realizado sem réplicas e representou apenas ensaios piloto de estabelecimento de protocolos que serviram de base para esta dissertação.

1.5 USO DE EMBRIÕES DE AVE COMO MODELO PARA ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE

Os embriões de aves são utilizados como modelos na embriologia por apresentarem semelhanças com embriões de mamíferos, pois também são animais amniotos. Segundo o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), uma análise de sequenciamento genético realizada em 2004 pelo *International Chicken Genome Sequencing Consortium* (ICGSC), demonstrou que o genoma da galinha possui DNA significativamente menor em relação ao genoma humano, porém com aproximadamente o mesmo número de

genes, de forma que 60% dos genes de galinha correspondem a um gene humano análogo e 75% dos pares de bases são idênticos entre galinha e humano. Segundo a ICGSC, essa análise do genoma de *Gallus gallus*, forneceu novos conhecimentos sobre a evolução do genoma e biologia humana, possibilitando a criação de novas estratégias em prol da saúde humana (NHGRI, 2004). Ademais, o embrião de galinha é considerado um ótimo modelo de estudo na área da embriologia e toxicologia devido às semelhanças morfológicas entre os embriões amniotos (Pough et al., 2008), especialmente no estágio filotípico (Irie & Kuratani, 2014).

Outras características também contribuem para a utilização da galinha como modelo de estudo, como a descrição dos estágios bem estabelecida e utilizada mundialmente, realizada através do trabalho de Hamburger & Hamilton (1951). Outro fator positivo é a ausência de interferência materna, pois a incubação e desenvolvimento ocorrem em ambiente externo, não sendo necessário o sacrifício materno para estudo dos embriões. Além disso, ovos férteis são de fácil aquisição, e o custo financeiro para manutenção é menor quando comparado a outros modelos de vertebrados. Os ovos são de fácil manipulação e armazenamento, sem a necessidade de um biotério, e o período de desenvolvimento embrionário é curto, de aproximadamente 21 dias, a depender da temperatura de incubação (Schoenwolf, 1999; Skeffington et al., 2018). Para que haja eclosão em 21 dias, são necessárias condições ótimas de temperatura (38°C), umidade e oxigenação. Se substâncias estranhas estiverem presentes durante o desenvolvimento embrionário, estas podem modificar os mecanismos de embriogênese e causar anormalidades ou a morte do embrião. Além disso, experimentos de embriotoxicidade utilizando a galinha como modelo são bem difundidos na literatura, como estudos de mortalidade, alterações morfológicas, alterações morfométricas, pesagem, histopatologia e expressão de RNAm (Petrovova et al., 2016; Chaudhary et al., 2017; Andleeb et al., 2018; Sharma, 2019).

Dessa forma, tomando proveito das características da galinha como modelo de estudo, e considerando o conhecimento escasso acerca deste agrotóxico sobre o desenvolvimento de organismos amniotos, em especial as aves, o presente trabalho verificou o efeito do fungicida Rovral® sobre o desenvolvimento embrionário de amniotos, utilizando como modelo embriões de galinha.

1.6 JUSTIFICATIVA

Os defensivos agrícolas são amplamente utilizados na agricultura, e é de extrema importância que sejam analisados quanto à sua toxicidade. Experimentos buscam investigar, através da contaminação de diversos organismos de forma aguda, por contato único com altas doses da substância em questão, a maneira como estes químicos podem afetar a saúde dos organismos vivos, incluindo o homem. Diversos agrotóxicos, incluindo fungicidas, têm potencial teratogênico, causando perturbações ao embrião, e podem trazer grandes riscos para a formação dos organismos em desenvolvimento, inclusive levando à sua morte. Considerando a falta de informações sobre este tema, no presente projeto foram avaliados os efeitos da aplicação do Rovral® (iprodiona) sobre o desenvolvimento embrionário de organismos amniotos, utilizando como modelo embriões de galinha, devido às facilidades de manipulação e suas semelhanças no desenvolvimento embrionário com demais indivíduos amniotos, incluindo os seres humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Analisar o efeito do Rovral® (iprodiona), em diferentes concentrações, durante a organogênese de galinha (*Gallus gallus*).

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal média (LC₅₀) para tratamento agudo de embriões de galinha *in ovo* através do estudo da mortalidade;
- Analisar alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário normal a partir da presença de malformações nos embriões tratados;
- Analisar alterações no crescimento embrionário a partir do peso total dos embriões;
- Verificar alterações na velocidade do desenvolvimento embrionário através do estadiamento dos embriões;
- Analisar alterações nas medidas e na simetria das estruturas do corpo durante o desenvolvimento embrionário através da morfometria dos embriões;
- Verificar o potencial mutagênico através da análise da presença de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos dos embriões;
- Verificar alterações da glicemia dos embriões tratados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho está em acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), tendo sido aprovado pela CEUA (Comissão de Ética na Utilização de Animais) da UNILA (processo de número 002/2018 – Anexo A).

3.1 AQUISIÇÃO, PREPARO E INJEÇÃO DOS OVOS

Ovos fertilizados no dia zero, logo após a postura, foram obtidos através de compra de produtores rurais da região e foram deixados armazenados em temperatura ambiente por um a seis dias, a depender do dia em que foram realizados os experimentos. Durante o período de armazenamento, devido à queda na temperatura, os embriões cessam o desenvolvimento, retomando-o apenas mediante incubação em temperaturas mais elevadas (Fasenko, 2007). Os ovos foram examinados em laboratório para defeitos e descartados na presença de danos na casca. Posteriormente, foi realizada a limpeza dos ovos com álcool etílico 70%, e sua pesagem em balança analítica (Marte, modelo AY220).

Os tratamentos foram feitos em triplicatas, realizadas em dias ou meses diferentes, para desconsiderar o viés temporal/sazonal dada a variação na temperatura e na viabilidade dos próprios ovos dependendo da época do ano. Adicionalmente, os ovos de cada lote também foram aleatorizados para desconsiderar o viés da coleta destes em diferentes dias da semana.

O tipo de contaminação utilizada durante o experimento foi a aguda, ou seja, com injeção única (McLaughlin et al., 1963). A câmara de ar do ovo é um local importante para experimentos toxicológicos, pois dispersa homogeneamente os contaminantes no embrião (Yamamoto et al., 2012) e, portanto, foi escolhida para a aplicação do teste agudo. Na câmara de ar do ovo (Figura 3A), foi confeccionado um buraco com auxílio de uma tesoura de ponta fina (Figura 3B), por onde foi injetado 1 µL da concentração específica do agrotóxico diluído em água deionizada autoclavada, ou apenas água (controle), para cada grama de ovo, com auxílio de uma micropipeta de volume ajustável (Figura 3C) (DeWitt et al., 2005). Os pesos dos ovos tratados variaram de 66,24 g a 38,74 g, com média de 53 g, e o peso dos ovos controles variaram de 68,33 g a 39,40 g, com média de 52,93 g. Portanto, para um ovo com peso de 50

g, foi injetado o volume de 50 μ L. Após a injeção, o buraco foi fechado com cola quente (Figura 3D).

Após a inoculação, os ovos foram mantidos em incubadora de rolagem automática com temperatura de 38°C e umidade constante pelo período de sete dias, pois nesse período do estágio embrionário a organogênese já está concluída e os órgãos e vasos sanguíneos já estão desenvolvidos, sendo possível realizar análises morfológicas e sanguíneas. Durante as primeiras duas horas após a inoculação, a rolagem da incubadora foi desligada e os ovos foram mantidos em posição vertical, com a câmara de ar do ovo voltada para cima. Esse método teve como finalidade o transpasse do agrotóxico pelas membranas, para que fosse absorvido pela gema. Após 2 horas, os ovos foram colocados aleatoriamente na horizontal pelos quadrantes da incubadora e a rolagem ligada. Os ovos foram aleatorizados entre os quadrantes para desconsiderar o viés da temperatura e umidade da incubadora, caso essas não se mantivessem constantes.

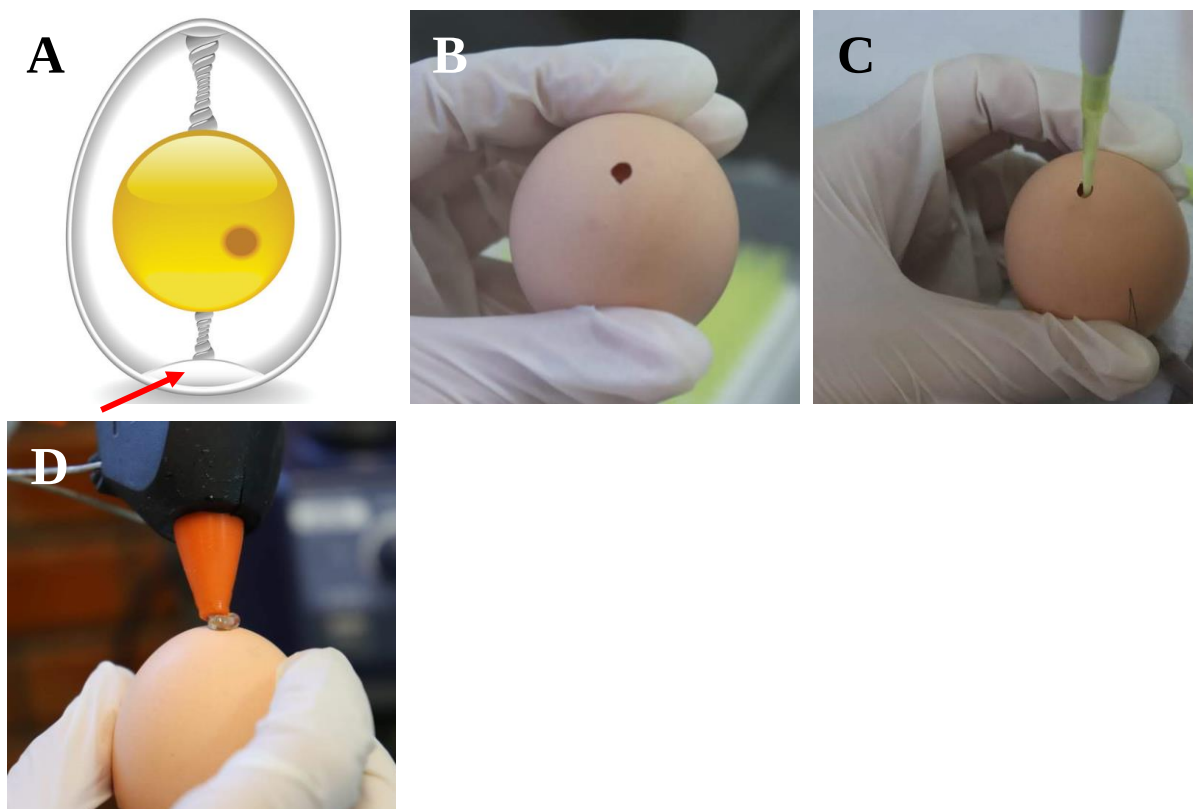


Figura 3 – Procedimentos experimentais de injeção. A – câmara de ar do ovo; B – furo realizado com auxílio de uma tesoura de ponta fina; C – injeção na câmara de ar do ovo; D – furo selado com cola quente. **Fontes:** Adrieli Barboza de Souza, 2019; VectorStock, 2020.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

3.2.1 Influência do controle nos ovos

Para efeitos de nomenclatura, serão chamadas de tratamentos as três possíveis formas de manipulação dos ovos: sem tratamento (sem qualquer intervenção no ovo), controle (ovos que receberam injeção de água deionizada autoclavada) ou tratado (ovos que receberam injeção do agrotóxico). Dentre os tratados, foram analisadas diferentes concentrações do agrotóxico, conforme explicado abaixo.

Inicialmente, para confirmar se houve influência do tratamento com água deionizada autoclavada (no caso dos controles), do furo na casca, ou da aplicação da cola quente, foram incubados ovos sem tratamento algum (74 ovos divididos em três réplicas), e ovos controles (74 ovos divididos em três réplicas), sendo utilizado um total de 148 ovos (Tabela 1). Todos os dados foram anotados em uma planilha (Tabela 1 do Apêndice A).

Tabela 1 – Grupos experimentais utilizados para verificar a influência do tratamento com água deionizada autoclavada

N amostral de ovos nos grupos experimentais			
Réplica	Sem tratamento	Controle	Total de ovos
1	20	20	
2	32	32	
3	22	22	
Total	74	74	148

3.2.2 Concentração letal média (LC₅₀) aguda do Rovral® e efeitos morfológicos

Os primeiros ensaios para encontrar a concentração letal média (LC₅₀) aguda do Rovral® foram realizados utilizando como ponto de partida resultados preliminares obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa (Arcain, 2017). Estes ensaios piloto tiveram início com a concentração de uso comumente recomendada pelo fabricante, de 1,5 µL/mL (diluído em água deionizada autoclavada), e testes com concentrações crescentes indicaram uma LC₅₀ para teste agudo do Rovral® em torno de aproximadamente 100 µL/mL, causando alterações

morfológicas nos embriões, em sua maioria hemorragias e microftalmia, assim como alterações morfométricas dos embriões tratados em relação aos controles, nos olhos e membros (Arcain 2017). É importante ressaltar que estes ensaios foram realizados com um número reduzido de ovos, sem repetições.

Assim, para este trabalho, os ensaios foram iniciados utilizando-se o Rovral® em concentrações crescentes de 40 µL/mL, 60 µL/mL, 80 µL/mL, 100 µL/mL, 120 µL/mL, 140 µL/mL (Tabela 2 do Apêndice A). Para esta primeira análise foi observado que não houve mudanças na mortalidade para as primeiras concentrações (40 µL/mL, 60 µL/mL e 80 µL/mL), sendo essas, então, descartadas das análises e os ensaios foram focados em concentrações maiores.

Assim, para as análises do presente estudo, foram utilizadas as seguintes concentrações crescentes, sempre em triplicata: 100 µL/mL, 300 µL/mL, 500 µL/mL e 750 µL/mL. Valores acima de 750 µL/mL não foram utilizados, pois a viscosidade do composto químico tornou-se um empecilho para a garantia de reprodutibilidade do experimento. Para o tratamento foram utilizados em média 20 ovos controles e 20 ovos tratados com concentrações crescentes de Rovral®, em triplicata, somando aproximadamente 120 ovos para cada tratamento, totalizando 490 ovos ao final do experimento (Tabela 2). Eventualmente, mais de três réplicas foram realizadas, quando se detectou problemas como, por exemplo, alterações no lote de ovos, temperatura de armazenamento alterada, queda de energia, entre outros aspectos externos. Para as análises, essas réplicas inconsistentes foram descartadas.

Tabela 2 – Concentrações e grupos experimentais utilizados para análise de embriotoxicologia de Rovral®.

N amostral de ovos nas concentrações e grupos experimentais									
Réplicas	100 µL/mL		300 µL/mL		500 µL/mL		750 µL/mL		Total de ovos
	C	T	C	T	C	T	C	T	
1	21	21	18	18	20	20	20	21	
2	20	21	20	21	21	21	20	21	
3	20	21	21	21	21	21	20	21	
Total	61	63	59	60	62	62	60	63	490

µL/mL – microlitro/mililitro; R – réplica; C – controle; T – tratado.

3.2.3 Análises sanguíneas

Para as análises de sangue, foram incubados, em triplicada, seis ovos controles e seis ovos tratados com a LC₂₅ encontrada (300 µL/mL), totalizando 36 ovos (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos experimentais utilizados para análise sanguínea de Rovral® na concentração da LC₂₅ (300 µL/mL).

N amostral de ovos nos grupos amostrais			
Réplicas	C	T	Total de ovos
1	6	6	
2	6	6	
3	6	6	
Total	18	18	36

LC – concentração letal; µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado.

3.3 COLETA E ANÁLISE DOS EMBRIÕES

3.3.1 Coleta e fixação

Após sete dias de incubação, os ovos foram retirados da incubadora para coleta. Uma hora antes da coleta, os ovos foram girados para garantir que os vasos sanguíneos vitelínicos se desprendessem da membrana da casca, permitindo sua abertura e visualização do embrião. Após este tempo, os ovos foram colocados horizontalmente em um suporte, e marcados com lápis na parte voltada para cima. Isto é feito pois o embrião possui menor densidade que a gema e a calaza (Figura 4A), uma estrutura que constitui um eixo de rotação e permite o posicionamento do embrião na parte superior da gema (Clavert, 1962), de forma que o embrião estaria posicionado nesta região no momento da abertura do ovo, facilitando a coleta.

Dentro da capela de exaustão de gases, cada ovo foi recoberto na região da marcação com lápis por uma fita adesiva. Com o auxílio de uma tesoura de ponta fina, foi realizado um furo na câmara de ar e, com uma seringa, foram retirados em média 5 mL de albúmen (Figura 4B). Posteriormente, foi aberta uma janela na porção recoberta pela fita adesiva com auxílio de uma tesoura de ponta fina (Figura 4C), sendo possível a observação do

embrião (Korn & Cramer, 2007). A fita adesiva impede que a casca se rache durante o procedimento. Todos os dados sobre a coleta foram anotados em uma planilha (Tabela 1 do Apêndice A).

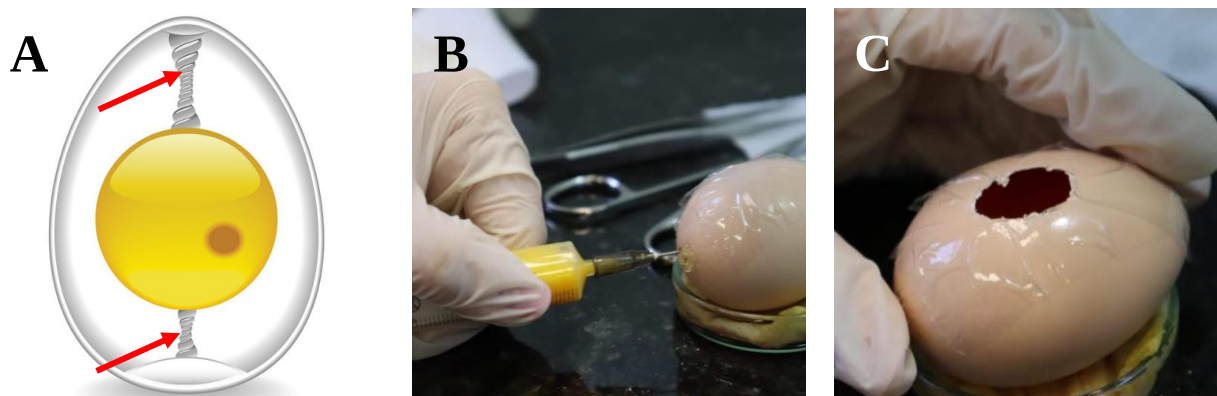


Figura 4 – Manipulação dos ovos para coleta. A – desenho esquemático de um ovo de galinha. As setas vermelhas indicam a calaza; B – retirada de albumina com auxílio de seringa; C – janela para observar o embrião. **Fontes:** Adrieli Barboza de Souza, 2019; VectorStock, 2020.

3.3.1.1 Mortalidade

Após a abertura do ovo, a situação do embrião foi analisada e classificada dentro de uma das seguintes categorias:

- Ovo não galado/fertilizado (Figura 5A), com blastodisco denso apresentando uma mancha branca de 2-3 milímetros (mm) de diâmetro, de bordas irregulares e presença de bolhas (Ross, 2017);
- Presença do embrião vivo (Figura 5B), com veias vitelínicas bem desenvolvidas e batimentos cardíacos visíveis;
- Presença de embrião morto (Figura 5C-D), com veias vitelínicas pouco ou nada desenvolvidas e sem batimentos cardíacos;
- Presença de sangue apenas e ausência de embrião, considerado como um embrião morto (Figura 5E);
- Ovo indefinido (Figura 5F), onde não foi possível detectar a presença de embrião (vivo ou morto), porém o ovo aparentava estar fertilizado, conforme descrito no guia de Ross (2017);
- Ovo estragado (Figura 5G), com aparência anormal da clara e da gema, como mescla entre ambas, regiões mais brancas com a presença de manchas escuras verdes ou marrons e cheiro pútrido.

A situação indefinida entrou como categoria pois são ovos em que os embriões morreram muito precocemente (Ross, 2017), possivelmente por não terem conseguido retomar o desenvolvimento após incubação. No entanto, não foi possível definir se a morte desses embriões foi ocasionada antes ou depois da aplicação do fungicida.

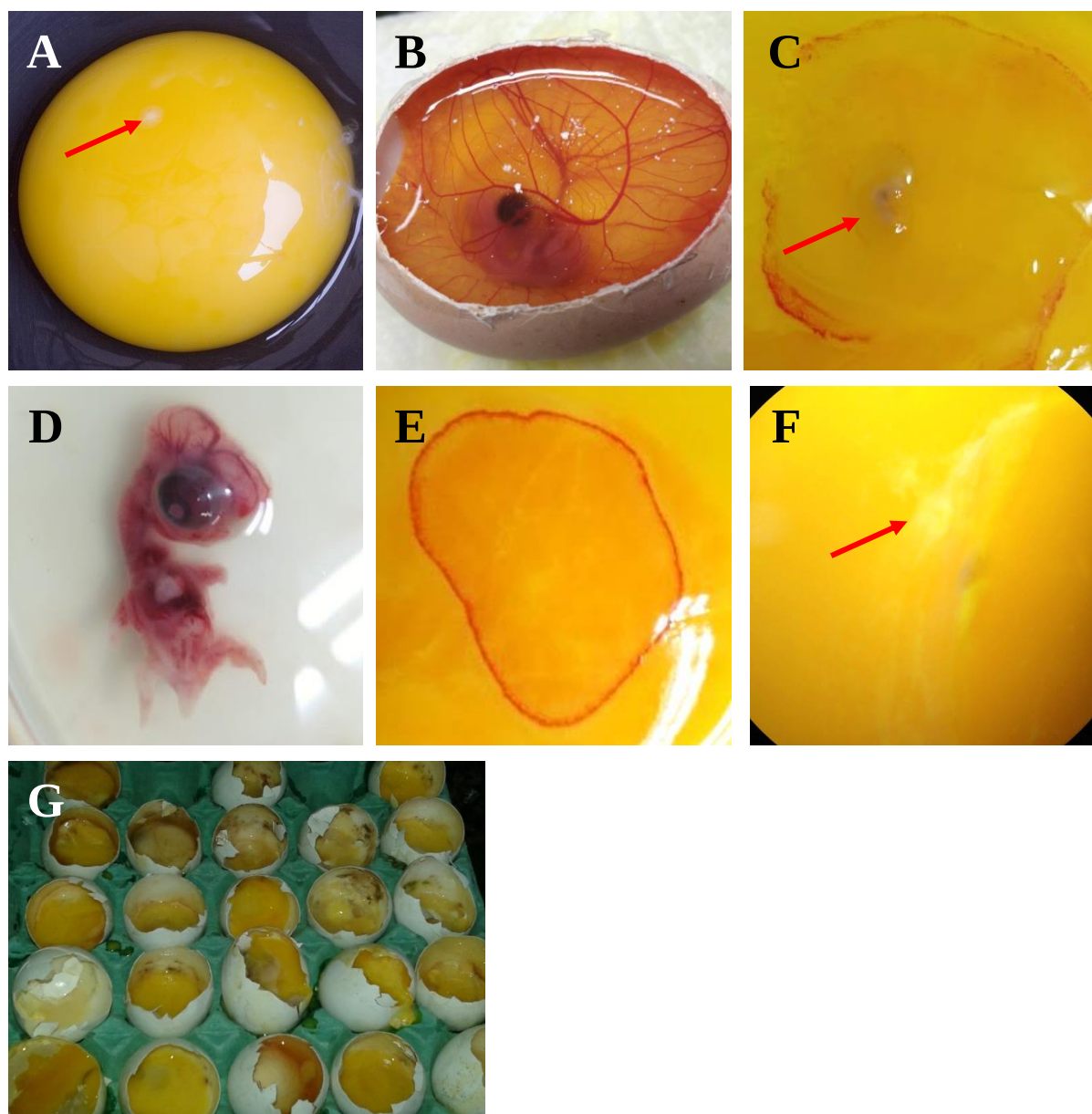


Figura 5 – Análise de mortalidade dos embriões. A – ovo não galado/fertilizado com blastodisco. A seta vermelha indica o blastodisco; B – embrião vivo no estágio de desenvolvimento esperado (aproximadamente HH33); C – embrião morto. A seta vermelha indica o embrião; D – embrião morto; E – presença somente de sangue, indicando embrião morto; F – indefinido com membrana esbranquiçada; G – ovos estragados. **Fontes:** Neto Ferreira, 2015; Beatriz M. S. Arcain, 2019; The Happy Chicken Coop, 2019.

3.3.1.2 Malformações

Com auxílio de colher, pinças histológicas e tesoura de ponta fina, os embriões foram passados para uma placa de Petri contendo tampão fosfato-salino (PBS pH 7,4) 1x (Sambrook et al., 1989; Sigma-Aldrich, 2020) para limpeza inicial, retirando as membranas embrionárias. O embrião foi colocado em outra placa de Petri contendo PBS 1x e levado ao microscópio estereomicroscópio Leica EZ4 HD, onde foram retiradas todas as membranas extraembrionárias restantes e observadas quaisquer malformações externas do embrião, tendo como base um embrião saudável nos estágios esperados de desenvolvimento (HH31-33, de acordo com Hamburger & Hamilton, 1951) (Figura 6). Durante as análises morfológicas, as malformações foram classificadas e anotadas em um formulário (Anexo B) nas seguintes categorias: (I) cefálicas, considerando alterações morfológicas do bico, crânio e encéfalo; (II) tronco, considerando alterações morfológicas dos órgãos abdominais/torácicos, disposição dos membros e alterações na estrutura do corpo; (III) membros, considerando alterações nos membros superiores e inferiores e dígitos; (IV) caudal, considerando alterações na região posterior do embrião; (V) olhos, considerando alterações no diâmetro ocular, pigmentação da íris e campo ocular; e/ou (VI) hemorrágica, considerando presença de sangue extravasado para os tecidos do corpo.



Figura 6 – Embrião saudável em estágio HH32. **Fonte:** Beatriz M. S. Arcain, 2019.

3.3.1.3 Estadiamento e pesagem

No momento da coleta, os estágios dos embriões foram estabelecidos conforme estipulado por Hamburger & Hamilton (1951). Adicionalmente, os embriões foram colocados em uma placa de Petri menor, tarada anteriormente em uma balança analítica Even FA2204B, onde foram pesados. Por fim, os embriões foram colocados em um tubo Falcon

contendo Carnoy para imediata fixação (Stanic et al., 2016). Os tubos foram etiquetados de acordo com o tipo de tratamento (controles, tratados com concentrações e réplicas) e data de coleta, e armazenados em geladeira (4°C) para posterior análise morfológica e morfométrica dos embriões em lupa. As cascas dos ovos foram descartadas em lixo comum, enquanto o constituinte do ovo (gema e clara) foi colocado em um galão para descarte apropriado.

3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Em um recipiente transparente, uma cama de parafina preta com 3 a 4 saliências de tamanhos diferentes foi confeccionada (Figura 7A). Cada embrião foi retirado do tubo Falcon com Carnoy e passado a uma placa de Petri com PBS 1x para limpeza. O embrião foi então alocado no recipiente contendo parafina preta, completamente submerso em PBS 1x. Para a captura de imagens e análise de morfologia e morfometria, foi utilizada uma lupa Zeiss SteREO de série Discovery.V12, com aumento de imagem de 8x.

Para as análises morfométricas, imagens do embrião foram capturadas com um software de imagem digital (AxioVision SE64) e os embriões classificados como vivos foram analisados para as seguintes medidas: membro superior (do ombro até dígitos), membro inferior (da coxa até dígitos), tronco (do ombro até a curva da cauda), cabeça (do encéfalo até o bico) e diâmetro dos olhos (globo ocular visível), tanto do lado esquerdo como do lado direito (Figura 7B) (Chaudhary et al., 2017).

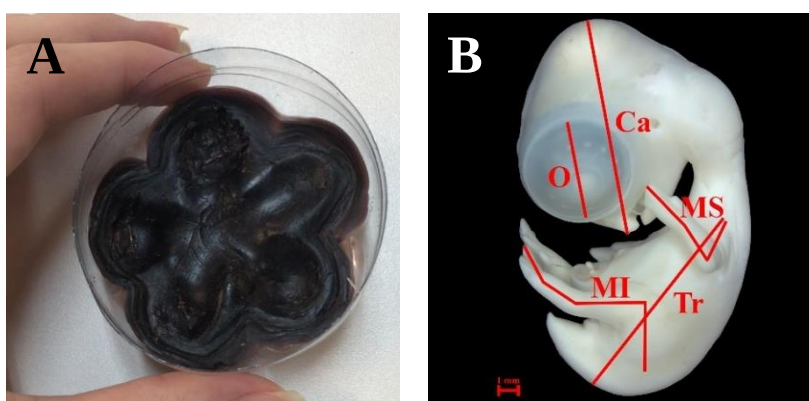


Figura 7 – Procedimentos de captura de imagens para análises morfológica e morfométrica. A – cama de parafina; B – medidas dos embriões; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco.
Fontes: Amanda Kawka Fischer, 2019; Beatriz M. S. Arcain, 2019.

3.5 ANÁLISES SANGUÍNEAS

Para as análises de sangue, a LC₂₅ foi utilizada por resultar em menor mortalidade comparada com a LC₅₀ e possuir efeitos toxicológicos subletais (Mosleh et al., 2003), possibilitando trabalhar com um número amostral reduzido. Para incubação e coleta foram utilizadas as mesmas metodologias descritas nos itens anteriores deste capítulo. No momento da quebra do ovo foi realizada a coleta de sangue com auxílio de pipetas Pasteur de vidro. Previamente, as pontas de pipetas Pasteur de vidro foram aquecidas em um bico de Bunsen e afinadas com auxílio de uma pinça, tendo sua extremidade cortada com uma tesoura de ponta fina (Figura 8A). Cada embrião foi coletado, secado rapidamente com papel toalha e deixado na placa de Petri por um minuto para que o sangue acumulasse em sua volta. Com o auxílio das pipetas previamente preparadas e tetinas de borracha, o sangue foi coletado (Figura 8B). As pipetas utilizadas foram descartadas apropriadamente após cada coleta. Os embriões foram fixados conforme descrito nos itens anteriores.

Para a análise de glicose, uma gota de sangue coletada de cada embrião foi imediatamente colocada em uma tira de teste e a concentração de glicose no sangue foi medida através de um glicosímetro da marca Accu-Chek® Active (Figura 8C).

Para as análises nucleares dos eritrócitos, uma gota de sangue foi imediatamente distendida em lâmina histológica pela técnica de esfregaço sanguíneo (Figura 8D), tendo sido preparadas três lâminas para cada embrião. Após a secagem de três horas, as lâminas foram fixadas em etanol por 30 minutos, seguido de secagem ao ar por três horas. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% (diluído em tampão fosfato pH 6,8) por 10 minutos (Figura 8E), lavadas em água corrente e, em seguida, secas ao ar, em temperatura ambiente.

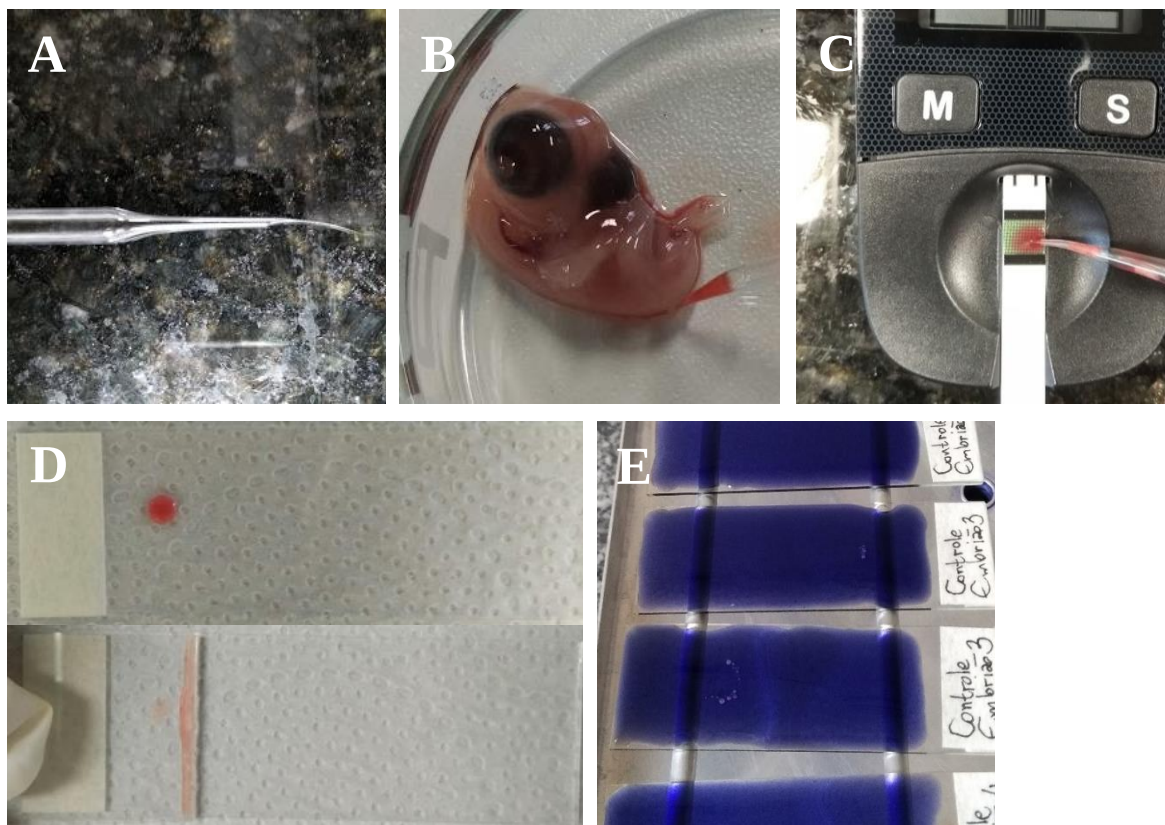


Figura 8 – Análises sanguíneas. A – ponta da pipeta Pasteur de vidro; B – coleta de sangue; C – sangue colocado na tira de teste do glicosímetro; D – esfregaço de sangue na lâmina histológica; E – lâminas coradas com Giemsa. **Fonte:** Beatriz M. S. Arcain, 2020.

Com aumento de 1000x em um microscópio Zeiss Axio Lab.A1, foram analisadas 1000 células por lâmina, contabilizando a presença de micronúcleos e anormalidades nos eritrócitos (Bruns & Ingram, 1973; Conceição & Protti, 2012), tendo como base um eritrócito saudável (Figura 9A).

Os micronúcleos (Figura 9B) foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech et al. (2003) e Freita et al. (2014), sendo considerados como micronúcleos partículas que:

- Não excedessem até 1/3 do diâmetro total do núcleo principal;
- Não possuíssem conexão com o núcleo e que permanecessem no citoplasma;
- Apresentassem formas arredondadas com bordas distinguíveis;
- Apresentassem mesma intensidade de coloração e refringência do núcleo principal.

A análise das anormalidades nos núcleos dos eritrócitos foi feita de acordo com Carrasco et al. (1990), sendo contabilizadas as seguintes modificações:

- Binucleado (Figura 9xC): uma única célula apresentando dois núcleos em seu citoplasma;
- *Bud* (Figura 9D): pequenas ou grandes evaginações de eucromatina formando brotos, que, apesar de se parecerem com micronúcleos, permanecem presos aos núcleos (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001);
- Lobado (Figura 9E): anormalidade do núcleo caracterizada por projeções da membrana nuclear de diferentes tamanhos, formando lobos;
- Bilobado (Figura 9F): anormalidade do núcleo caracterizada pela projeção da membrana nuclear formando um lobo, conferindo ao núcleo a aparência de uma ampulheta;
- *Notched* (Figura 9G): uma pequena invaginação na parede do núcleo, em forma de fenda, que se estende para dentro do núcleo. A fenda é delimitada pelo envelope nuclear e não possui material genético.

Células que não apresentaram coloração no núcleo (Figura 9H), células com núcleo muito claro (Figura 9I), células de defesa (Figura 9J) que apresentaram um núcleo maior comparado ao núcleo do eritrócito e células com citoplasma (Figura 9K) ou núcleo danificado (Figura 9L) não foram consideradas na contagem.

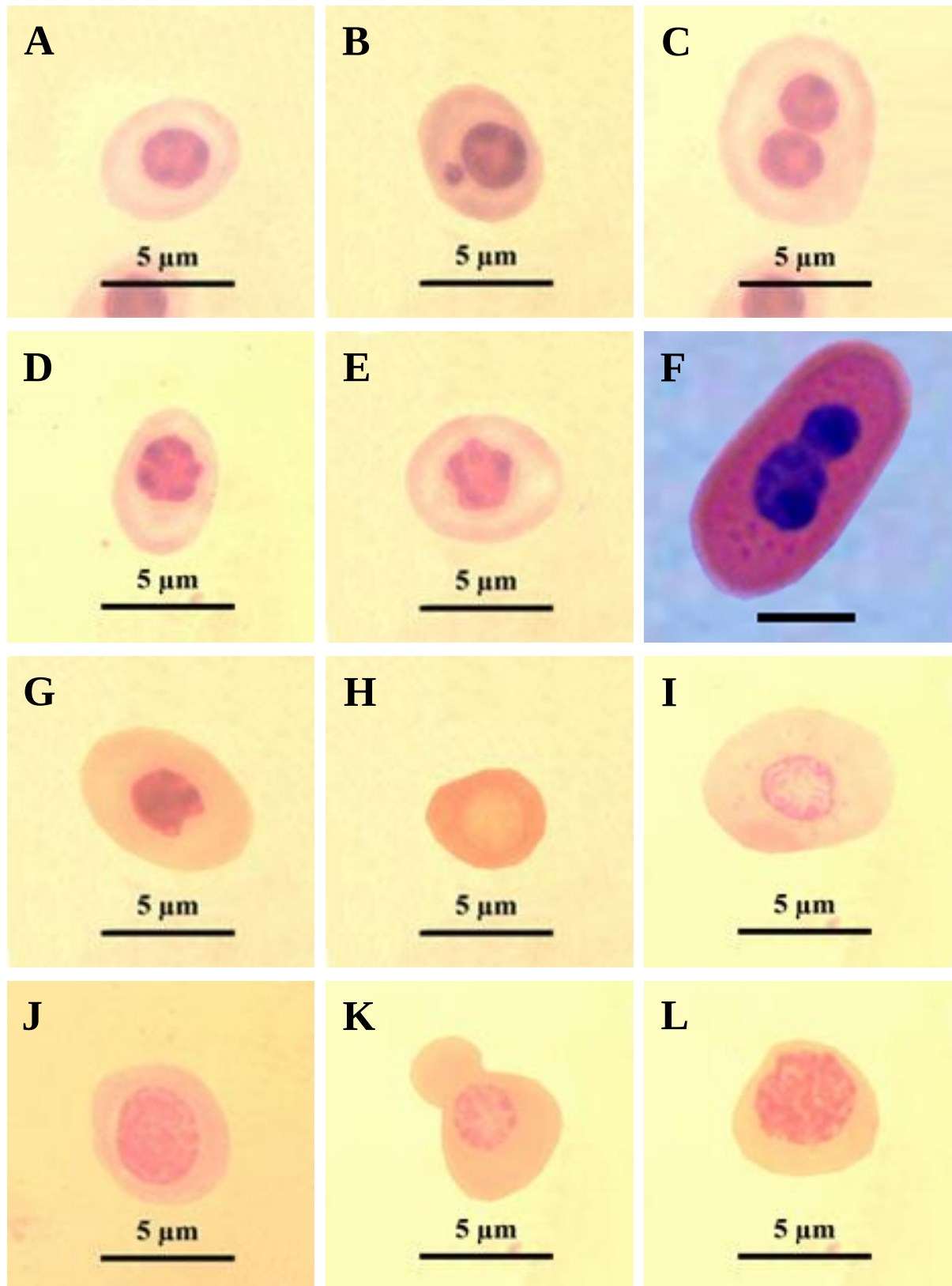


Figura 9 – Análises de anormalidades nucleares. A – hemácia normal; B – micronúcleo; C – hemácia binucleada. D – *bud*; E – lobada; F – bilobada; G – *notched*; H – coloração incorreta; I – célula com núcleo claro; J – célula de defesa; K – citoplasma danificado; L – núcleo danificado. **Fontes:** Harabawy & Mosleh, 2014; Beatriz M. S. Arcain, 2020.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabelados e tratados. As variáveis de mortalidade e presença de malformações foram transformadas em porcentagem. A presença de malformações foi contabilizada apenas nos embriões vivos. As variáveis de peso (em grama), estadiamento (em HH), medidas do corpo (em mm), assimetria bilateral (em módulo), glicemia (em mg/dL) e número de micronúcleos e de aberrações nucleares (números absolutos) foram transformadas em média, levando em conta apenas os dados dos embriões vivos. Ovos inférteis, ovos estragados e aqueles onde não foi possível detectar a presença de embrião (vivo ou morto), considerados como indefinidos, foram descartados das análises.

Para a verificação da LC_{50} , através do programa Excel, um gráfico linear com equação da reta foi confeccionado a partir dos dados obtidos com os experimentos, possibilitando a estimativa da LC_{50} . No mesmo programa, o R^2 , também chamado de coeficiente de determinação, foi utilizado para auxiliar na confecção dos gráficos. Este coeficiente é uma medida de ajuste que avalia quanto o modelo analisado é capaz de explicar os dados coletados. Ele é calculado pela razão entre a variação explicada e a variação total, variando de 0 (pouco ajustado) a 1 (bem ajustado).

Para as análises seguintes, os fatores fixos foram os tratamentos (controle ou tratado) e as concentrações do Rovral® (100 $\mu\text{L/mL}$, 300 $\mu\text{L/mL}$, 500 $\mu\text{L/mL}$ e 750 $\mu\text{L/mL}$, em triplicata).

Para testar se o tratamento com Rovral® apresentou diferenças significativas com seu respectivo controle, e também entre controle e ovos sem tratamento, as médias de cada tratamento e respectivas réplicas foram obtidas. Inicialmente, foi testada a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e, caso constatada a normalidade, foi realizado o teste t pareado. Em caso negativo mesmo após transformação dos dados (em raiz quadrada), foi aplicado o teste de Wilcoxon.

Em seguida, para verificar se as diferentes concentrações resultaram em efeitos com diferenças significativas entre si, as médias de cada tratamento e respectivas réplicas foram subtraídas das médias dos seus respectivos controles, uma vez que cada experimento foi realizado com seu próprio controle, para auxiliar na redução do acaso do experimento. Os valores em que a média dos controles foi maior que a média dos tratados resultaram em números negativos, e, então, para que as análises estatísticas não gerassem erro,

foi somado o valor de 10 (ou 15 para as anormalidades dos eritrócitos) em cada média. Os valores das diferenças das médias em cada réplica foram então utilizados para as análises estatísticas. Para cada análise, inicialmente foram realizados testes de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de Levene, para testar homocedasticidade (homogeneidade das variâncias). A verificação da homogeneidade das variâncias é necessária para que a Análise de Variância (ANOVA) tenha validade. Para dados que apresentaram normalidade e homocedasticidade, foi utilizado o teste de ANOVA *One Way* seguido de teste *a posteriori* de Tukey, caso o primeiro fosse significativo. Para análises com ausência de normalidade e/ou homocedasticidade, os dados foram transformados aplicando-se a raiz quadrada em todos os valores, seguido de novos testes de normalidade e homocedasticidade. Em caso de permanência de significância, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com *posteriori* de Dunn.

4 RESULTADOS

4.1 CONTROLE X SEM TRATAMENTO

Para verificar se o uso de água deionizada autoclavada, injeção e uso da cola quente não causaria impacto sobre o desenvolvimento embrionário, foi realizado um ensaio, com três réplicas, de injeção de água (controle) ou nenhuma intervenção (sem tratamento).

Para as análises de mortalidade e malformações foram considerados apenas os embriões vivos e mortos, tendo sido coletados no total 69 embriões sem tratamento e 71 embriões controles. As porcentagens de mortalidade podem ser observadas na Tabela 4 (dados brutos encontram-se nas Tabelas 3-4 do Apêndice A). Ao analisar os dados, foi verificado que não houve diferença estatística para a mortalidade entre os dois grupos (Figura 10A).

Tabela 4 – Mortalidade bruta, N amostral e percentual da mortalidade segundo os diferentes tratamentos e réplicas.

Réplica	Sem tratamento			Controle		
	Mortalidade bruta	N amostral	% de mortalidade	Mortalidade bruta	N amostral	% de mortalidade
1	0	20	0,00	1	19	5,26
2	1	27	3,70	2	32	6,25
3	1	22	4,55	3	20	15,00

Malformações foram encontradas somente nos embriões vivos. As malformações ocorreram no olho e encéfalo em um embrião sem tratamento e microftalmia, hemorragia e encéfalo malformado em dois embriões controles (Tabela 5 do Apêndice A). As porcentagens de malformações podem ser observadas na Tabela 5. Após realização o teste estatístico, foi constatado que não houve diferença estatística para a presença de malformação entre ambos grupos (Figura 10B).

Tabela 5 – Malformação bruta, N amostral e percentual da malformação segundo os diferentes tratamentos e réplicas.

Réplica	Sem tratamento			Controle		
	Malformação bruta	N amostral	% de malformação	Malformação bruta	N amostral	% de malformação
1	0	20	0,00	2	19	10,53
2	1	27	3,70	0	32	0,00
3	0	22	0,00	0	20	0,00

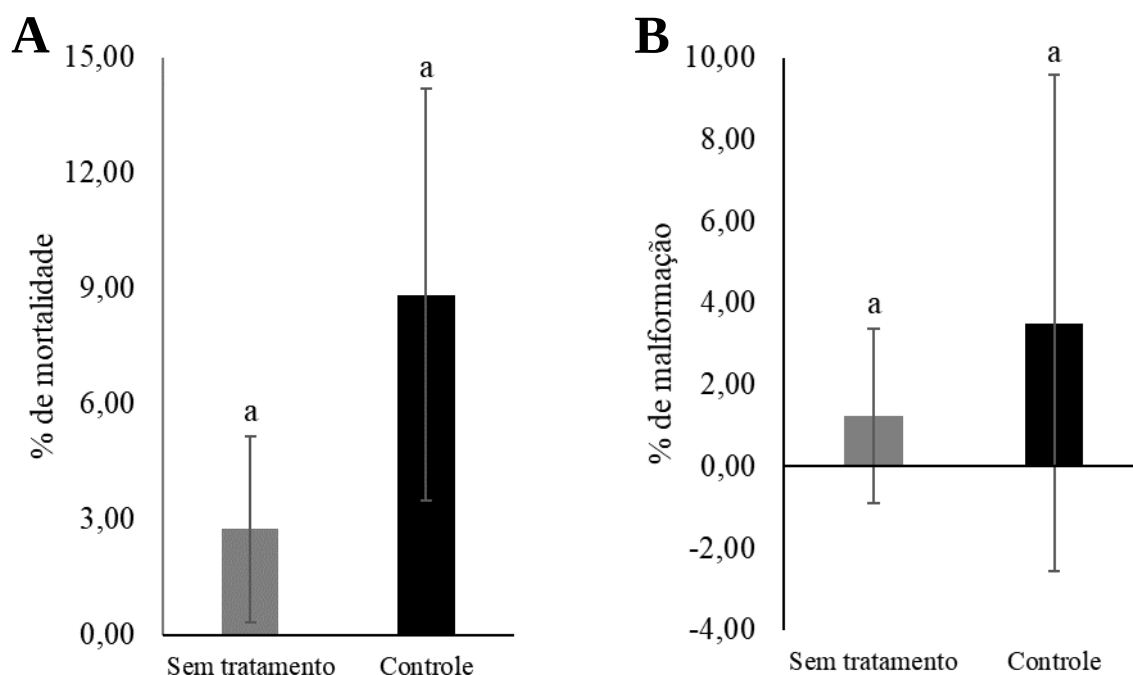


Figura 10 – Comparação entre ovos sem tratamento e ovos controle, apresentado em percentual e desvio padrão segundo os diferentes tratamentos. A – mortalidade (t pareado: $p = 0,1195$); B – malformações (Wilcoxon: $p = 0,6547$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Assim, concluiu-se que não houve alterações no grupo controle resultantes da injeção aguda com água, sendo esta metodologia utilizada como controle para os próximos experimentos.

4.2 TRATAMENTO AGUDO

4.2.1 Encontrando a LC_{50}

Inicialmente, foi realizada análise para identificar se houve diferença na porcentagem de ovos inférteis, indefinidos e estragados entre os grupos controle e tratado (Tabela 14 do Apêndice A). Foi observado que não houve diferença estatística dos tratamentos com relação aos seus respectivos controles (Gráfico 1 do Apêndice B). Assim, os ovos inférteis, estragados e indefinidos foram desconsiderados das análises, sendo utilizados apenas os embriões vivos e mortos para as análises a seguir.

Os dados de mortalidade para as três réplicas das quatro concentrações analisadas podem ser observados na Tabela 6 (dados brutos encontram-se nas Tabelas 6-13 do Apêndice A). Foi constatado que houve diferença significativa para todos os tratamentos com

relação a seus respectivos controles, indicando que os tratamentos afetaram a taxa de mortalidade, conforme pode ser observado na Figura 11A.

Tabela 6 – Mortalidade bruta, N amostral e percentual da mortalidade segundo as diferentes concentrações, tratamentos e réplicas.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Controle			Tratado		
	Mortalidade bruta	N amostral	% de mortalidade	Mortalidade bruta	N amostral	% de mortalidade
100 _{R1}	2	20	10,00	4	18	22,22
100 _{R2}	1	17	5,88	3	14	21,43
100 _{R3}	2	19	10,53	4	20	20,00
300 _{R1}	1	17	5,88	5	17	29,41
300 _{R2}	1	20	5,00	4	16	25,00
300 _{R3}	0	20	0,00	6	20	30,00
500 _{R1}	1	16	6,25	8	18	44,44
500 _{R2}	1	19	5,26	8	19	42,11
500 _{R3}	3	20	15,00	10	21	47,62
750 _{R1}	0	14	0,00	3	12	25,00
750 _{R2}	2	19	10,53	5	16	31,25
750 _{R3}	3	18	16,67	8	21	38,10

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; R – réplica.

Para analisar se houve diferença para mortalidade entre as concentrações, foi calculada a diferença entre as porcentagens de controle e tratado (média do tratado – média do controle), para cada concentração e cada réplica (Tabela 15 do Apêndice A). Após análise estatística dos dados, foi constatado que as concentrações apresentaram diferenças significativas entre si. Ao utilizar o teste *a posteriori*, foi possível determinar que o tratamento com 100 $\mu\text{L/mL}$ diferiu de todas as demais concentrações ($p = 0,0120$; $0,0001$; e $0,0329$ para 300 $\mu\text{L/mL}$, 500 $\mu\text{L/mL}$ e 750 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente), o tratamento com 300 $\mu\text{L/mL}$ diferiu do grupo tratado com 500 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0168$) mas foi semelhante ao de 750 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,8757$), e o tratamento de 500 $\mu\text{L/mL}$ diferiu de 750 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0063$). Portanto, podemos afirmar que todos os grupos de tratamentos diferiram estatisticamente entre si, excetuando-se aqueles com as concentrações 300 $\mu\text{L/mL}$ e 750 $\mu\text{L/mL}$, conforme pode ser observado na Figura 11B.

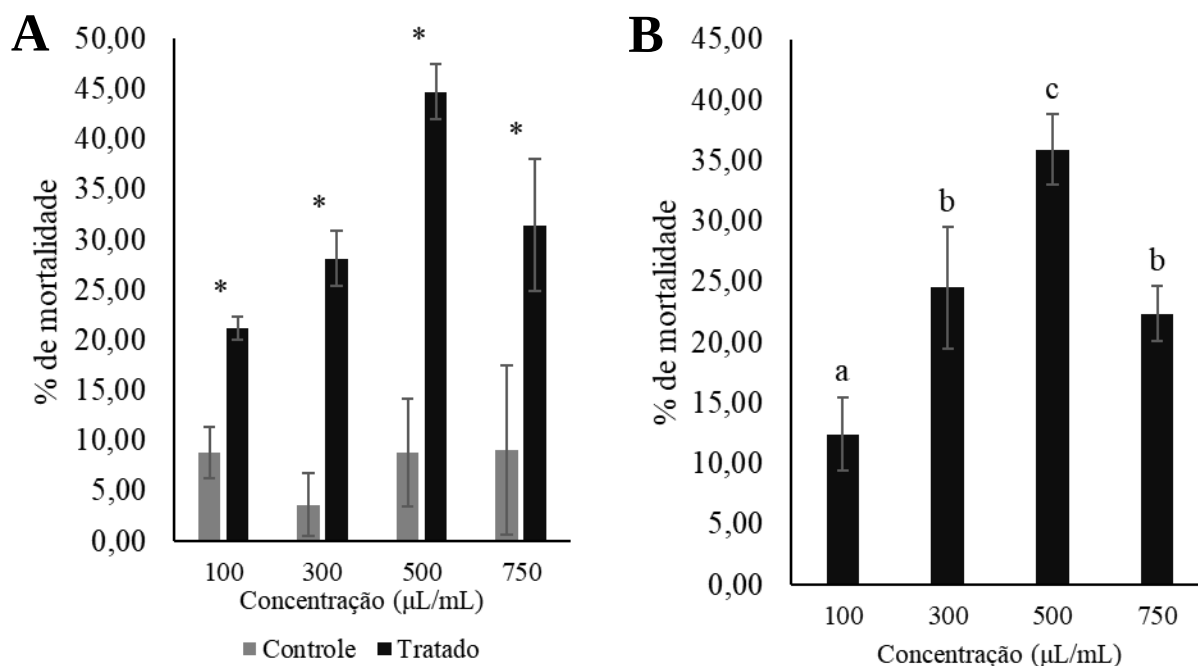


Figura 11 – Análise de mortalidade, em percentual e desvio padrão. A – segundo as diferentes concentrações e tratamentos (t pareado: $p = 2,1982 \cdot 10^{-6}$); B – segundo as diferentes concentrações (Kruskal-Wallis: $p = 0,0002$); µL/mL – microlitro/mililitro; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

A partir dos dados de mortalidade da Tabela 6, foi confeccionado um gráfico estimando a LC_{50} (Figura 12A). Inicialmente, quando foram consideradas as quatro concentrações testadas, o gráfico apresentou uma tendência crescente de mortalidade e, ao chegar na concentração de 750 µL/mL, a mortalidade diminuiu. O valor de R^2 do gráfico confeccionado incluindo a concentração 750 µL/mL foi baixo (0,2286). Considerando os valores obtidos, o modelo explica 22% da variação, portanto, o R^2 demonstrou que quando a concentração de 750 µL/mL está incluída, os dados não estão bem descritos. Assim, a concentração de 750 µL/mL foi considerada como um *outlier*, tendendo a reta para um valor anormal, e foi retirada das análises.

Após a retirada do *outlier*, um novo gráfico foi confeccionado (Figura 12B). Utilizando apenas as três concentrações iniciais, o valor de R^2 foi alto (0,9046), representando um bom ajuste que explica 90% das variáveis. Com a equação da reta do gráfico, o eixo y foi substituído por 50% (representando 50% de mortalidade) e foi obtido o valor de 738 µL/mL para o eixo x (representando as concentrações). Assim, o valor estimado da LC_{50} a partir dos resultados da equação da reta foi de 738 µL/mL.

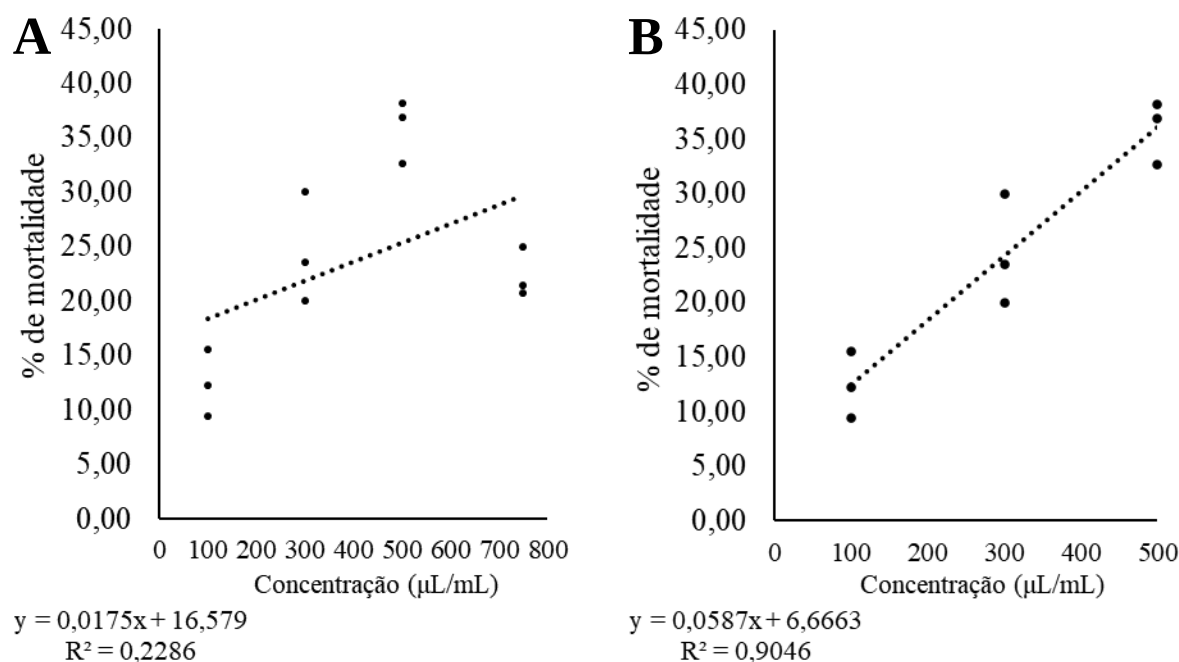


Figura 12 – Equação da reta representando as taxas de mortalidade nas diferentes concentrações de Rovral®. A – incluindo a concentração de 750 µL/mL; B - excluindo a concentração de 750 µL/mL; µL/mL – microlitro/mililitro; R^2 - coeficiente de determinação.

4.2.2 Análise morfológica

4.2.2.1 Análise de malformações

Durante a coleta, foram observadas malformações em estruturas do encéfalo, olhos, bico, membros inferiores, cauda, órgãos e tronco. Todas as malformações encontradas em embriões vivos e mortos podem ser visualizadas nas Tabelas 16-19 do Apêndice A.

A Figura 13 traz resumidamente a incidência dos tipos de malformações segundo as concentrações e tratamentos. Alguns embriões apresentaram mais de um tipo de malformação. A Figura 14 ilustra alguns tipos de malformações encontradas nos embriões tratados.

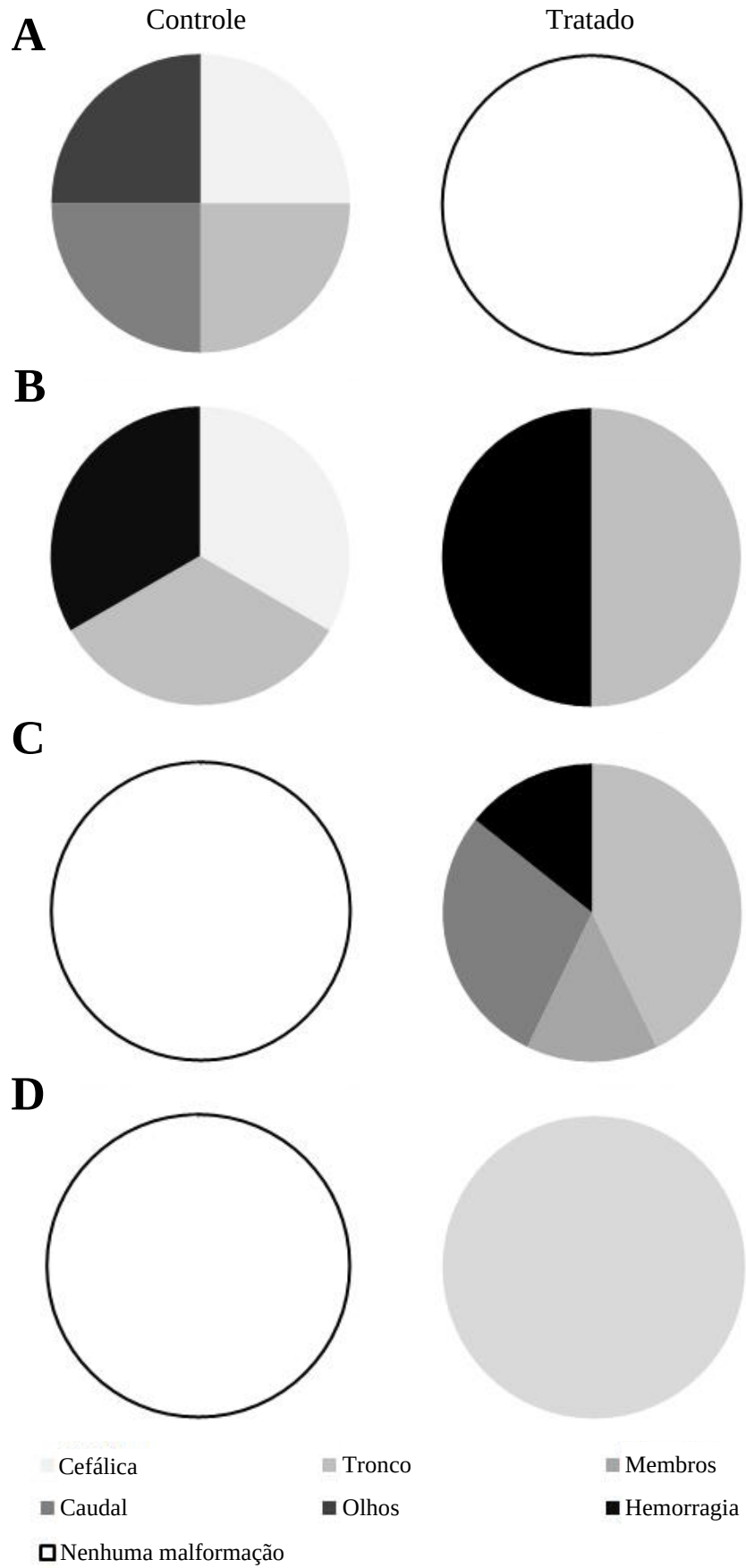


Figura 13 – Tipos de malformações em embriões vivos nas diferentes concentrações e respectivos controles. A - 100 $\mu\text{L/mL}$; B - 300 $\mu\text{L/mL}$; C - 500 $\mu\text{L/mL}$; D - 750 $\mu\text{L/mL}$.

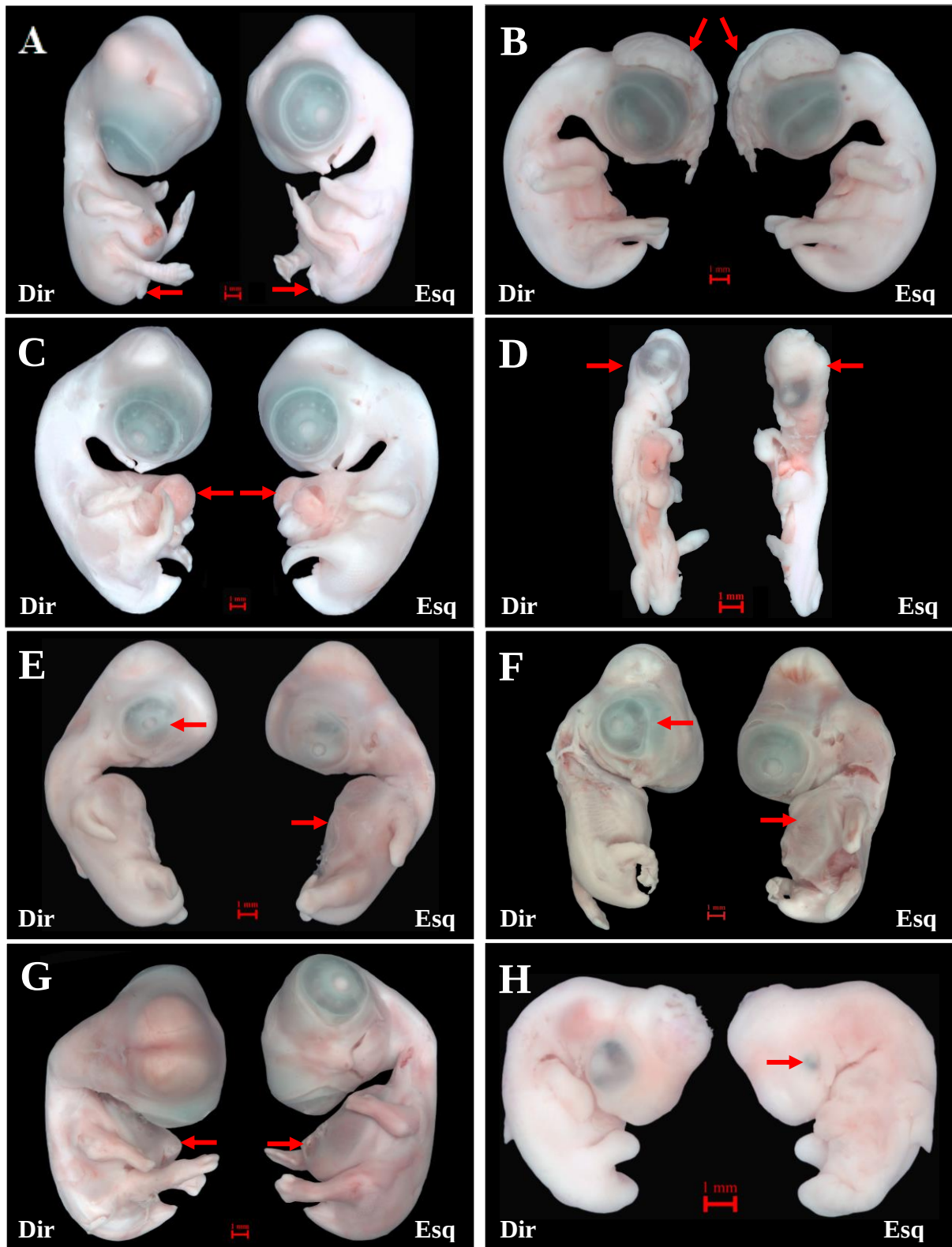


Figura 14 – Exemplos de malformações encontradas nos embriões tratados. A-C – embriões vivos; D-H – embriões mortos; A – cauda atrofiada; B – encéfalo amassado e sem fechamento cranial correto; C – órgãos protuberantes; D – região cranial incompleta e tronco torcionado; E – hemorragia por todo o corpo (principalmente do lado esquerdo), cabeça e órgãos e microftalmia (lado direito); F – microftalmia (olho direito) e hemorragia por todo o corpo (principalmente do lado esquerdo), cabeça e órgãos; G – hemorragia por todo o corpo e órgãos aparentemente protuberantes; H – microftalmia (lado esquerdo) e hemorragia por todo o corpo, cabeça e órgãos; Esq – lado esquerdo do embrião; Dir – lado direito do embrião. **Fonte:** Beatriz M. S. Arcain, 2019.

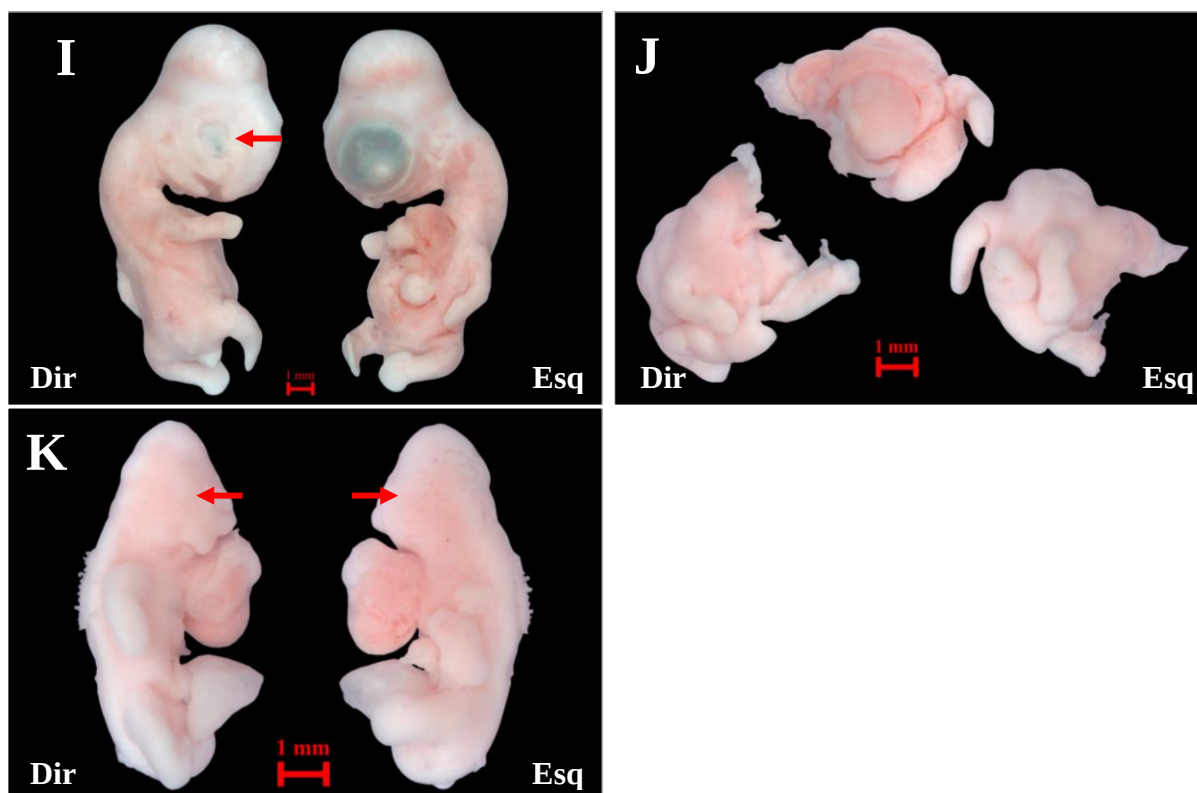


Figura 14 – Exemplos de malformações encontradas nos embriões tratados. I-K – embriões mortos; I – microftalmia (lado direito), hemorragia pelo corpo e órgãos; J – região cefálica incompleta, tronco deformado e anaftalmia (ocasionada pela ausência de cabeça); K – ausência de mandíbula e cérebro, assim como anaftalmia; Dir – lado direito do embrião; Esq – lado esquerdo do embrião. **Fonte:** Beatriz M. S. Arcain, 2019.

Para a análise estatística das malformações, foi seguido o mesmo procedimento relatado para mortalidade, utilizando a incidência de embriões vivos que apresentaram algum tipo de malformação. Inicialmente, foi calculada a porcentagem de malformações para cada grupo (Tabela 7) e analisado se os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles. Foi constatado que não houve diferença significativa, indicando que os tratamentos não afetaram a taxa de malformação em embriões vivos, conforme pode ser observado na Figura 15A.

Tabela 7 – Malformação bruta, N amostral e percentual da malformação segundo as diferentes concentrações, tratamentos e réplicas.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Controle			Tratado		
	Malformação bruta	N amostral	% de malformação	Malformação bruta	N amostral	% de malformação
100 _{R1}	0	18	0,00	0	14	0,00
100 _{R2}	1	16	6,25	0	11	0,00
100 _{R3}	1	17	5,88	0	16	0,00
300 _{R1}	2	16	12,50	0	12	0,00
300 _{R2}	0	19	0,00	1	12	8,33
300 _{R3}	1	20	5,00	1	14	7,14
500 _{R1}	0	15	0,00	0	10	0,00
500 _{R2}	0	18	0,00	0	11	0,00
500 _{R3}	0	17	0,00	4	11	36,36
750 _{R1}	0	14	0,00	1	9	11,11
750 _{R2}	0	17	0,00	0	11	0,00
750 _{R3}	0	15	0,00	0	13	0,00

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; R – réplica.

Para analisar se houve diferença para incidência de malformações dos embriões vivos entre as concentrações, foi calculada a diferença entre as quantidades de malformações do controle e tratado (média do tratado – média do controle), para cada concentração e cada réplica (Tabela 20 do Apêndice A). Os números negativos representam uma diferença onde a porcentagem do controle foi maior que a do tratado. A análise estatística não foi significativa, indicando que não houve diferença na porcentagem de malformações encontradas entre as diferentes concentrações (Figura 15B).

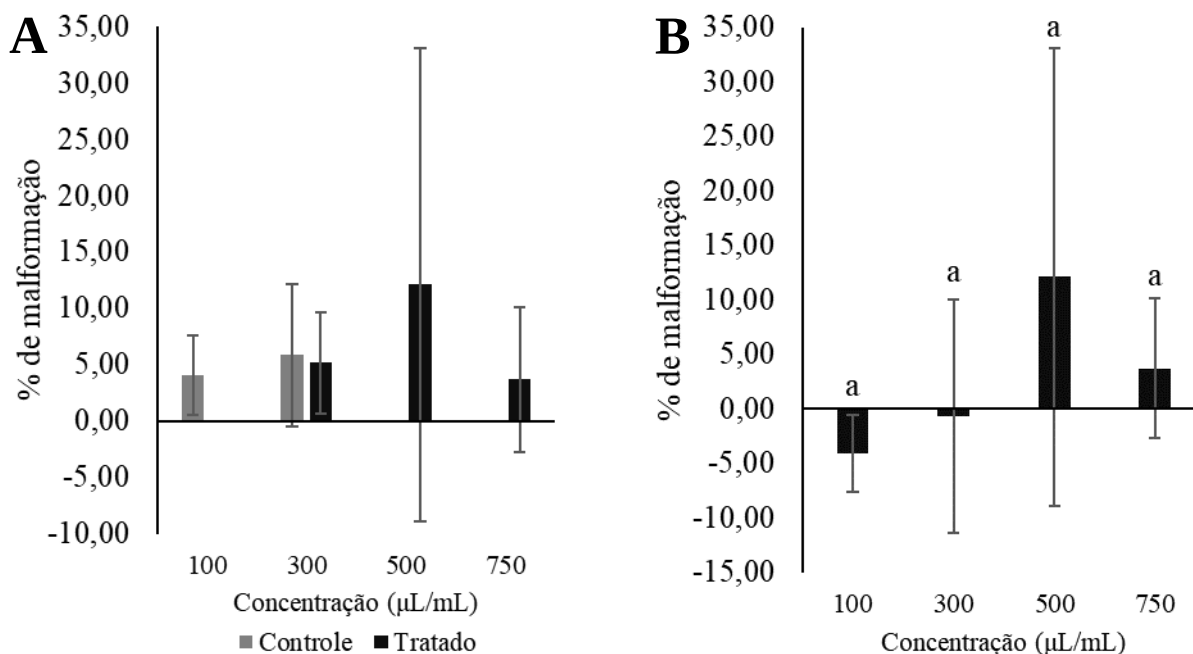


Figura 15 - Análise de malformação, em percentual e desvio padrão. A - segundo as diferentes concentrações e tratamentos (Wilcoxon: $p = 0,6120$); B - segundo as diferentes concentrações (Kruskal-Wallis: $p = 0,4081$); µL/mL – microlitro/mililitro; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.2.2 Análise dos estágios de desenvolvimento e peso dos embriões vivos

Ainda no momento da coleta, os embriões foram pesados e estadiados, seguindo a bibliografia de Hamburger & Hamilton (1951). Todos os estágios encontrados podem ser visualizados nas Tabelas 6-13 do Apêndice A.

Os embriões mortos que puderam ser analisados ($n = 40$) se desenvolveram entre os estágios HH13 e HH33, correspondendo a um período de 48-52 horas a sete dias e meio de desenvolvimento (Tabela 21 do Apêndice A). Entretanto, devido à dificuldade de estadiar embriões mortos, apenas os embriões vivos ($n = 346$) foram utilizados para as análises estatísticas. Estes se apresentaram entre os estágios HH24 e HH35, correspondendo ao período de quatro a nove dias de desenvolvimento (Tabela 22 do Apêndice A).

As médias dos estágios dos embriões vivos em cada tratamento e respectivas réplicas podem ser visualizada na Tabela 8. A análise estatística demonstrou que as diferenças não foram significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles (Figura 16A), e nem entre as concentrações (Figura 16B) (dados da subtração das médias dos tratados pelos controles encontram-se na Tabela 23 do Apêndice A), indicando que os embriões vivos

conseguiram se desenvolver de forma semelhante aos controles e entre as concentrações, no que diz respeito aos estádios do desenvolvimento.

Tabela 8 – Média dos estágios (HH) dos embriões vivos segundo as diferentes concentrações, tratamentos e respectivas réplicas.

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$) _{Réplica}	Controle	Tratado
100 _{R1}	32,72	32,07
100 _{R2}	31,56	31,45
100 _{R3}	31,24	31,50
300 _{R1}	31,63	31,17
300 _{R2}	32,53	32,08
300 _{R3}	32,35	32,71
500 _{R1}	31,87	32,10
500 _{R2}	32,47	32,21
500 _{R3}	32,00	32,27
750 _{R1}	32,43	30,78
750 _{R2}	32,35	32,18
750 _{R3}	31,73	31,31

HH – Hamburger & Hamilton (1951); $\mu\text{L}/\text{mL}$ – microlitro/mililitro; R – réplica.

De forma semelhante, a análise dos dados demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos e seus respectivos controles (Figura 17A) e entre as diferentes concentrações para os pesos dos embriões vivos (Figura 17B), demonstrando que os embriões vivos conseguiram se desenvolver de forma semelhante aos controles e entre as concentrações, no que diz respeito ao peso total do embrião. Todos os pesos encontrados podem ser visualizados nas Tabelas 6-13 do Apêndice A. A tabela contendo a diferença entre as médias dos tratados em relação aos seus respectivos controles pode ser visualizada na Tabela 24 do Apêndice A e todas as médias de cada tratamento e respectivas réplicas podem ser visualizadas na Tabela 9.

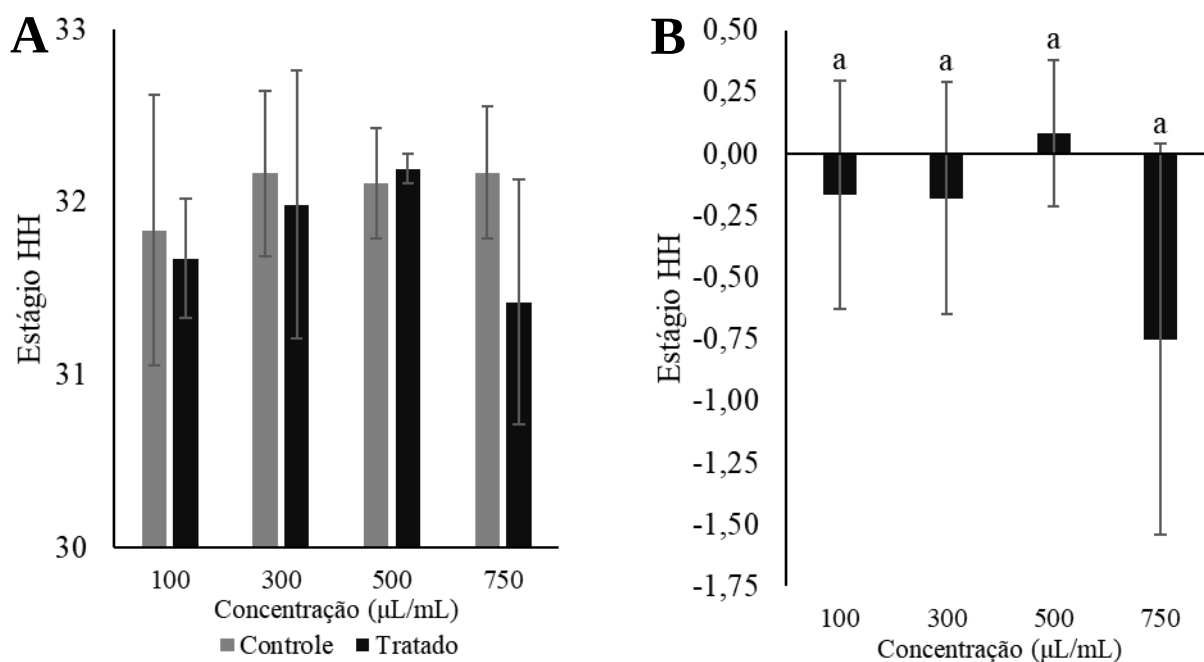


Figura 16 - Média e desvio padrão das diferenças dos estágios (HH) dos embriões vivos. A – segundo as diferentes concentrações e tratamentos (t pareado: $p = 0,1411$); B - segundo as diferentes concentrações (Kruskal-Wallis: $p = 0,536$); HH – Hamburger & Hamilton (1951); µL/mL – microlitro/mililitro; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 9 – Média dos pesos (em gramas) dos embriões vivos segundo as diferentes concentrações, tratamentos e respectivas réplicas.

Concentração (µL/mL) Réplica	Controle	Tratado
100 _{R1}	1,1467	1,0358
100 _{R2}	0,9130	0,9392
100 _{R3}	0,9431	0,9317
300 _{R1}	0,9869	0,9166
300 _{R2}	1,0805	1,0366
300 _{R3}	1,0195	1,1085
500 _{R1}	0,9761	1,0077
500 _{R2}	0,9798	0,9177
500 _{R3}	0,9649	1,0438
750 _{R1}	1,0588	0,8147
750 _{R2}	1,0337	1,0455
750 _{R3}	0,9730	0,9000

µL/mL – microlitro/mililitro; R – réplica.

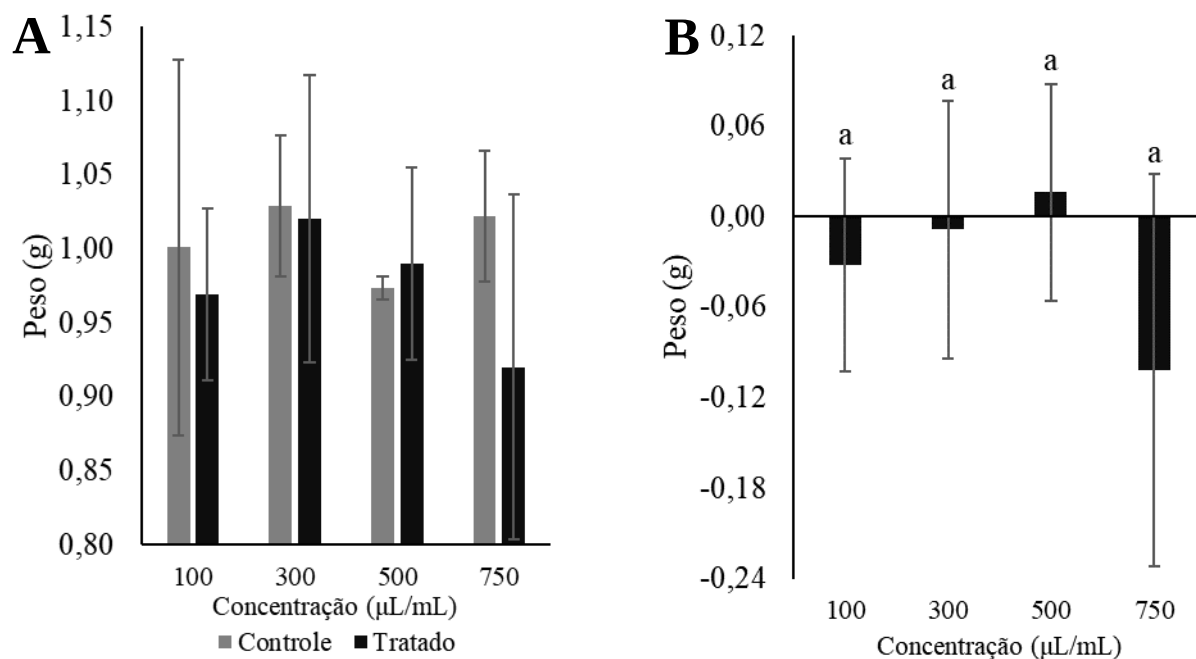


Figura 17 – Média e desvio padrão dos pesos (em gramas) dos embriões vivos. A – segundo as diferentes concentrações e tratamentos (t pareado: $p = 0,2579$); B – segundo as diferentes concentrações (ANOVA *One Way*: $p = 0,4824$); g – grama; µL/mL – microlitro/mililitro; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.3 Análise morfométrica dos embriões vivos

Os embriões vivos ($n = 346$) foram fixados e armazenados para as análises de morfometria. Foram capturadas, na lupa, imagens de ambos os lados (direito e esquerdo), sendo avaliados os parâmetros descritos na sessão 3.4 de Materiais de Métodos. Todas as medidas encontradas podem ser visualizadas nas Tabelas 25-32 do Apêndice A.

4.2.3.1 Análise das medidas dos embriões

Para as medidas do lado direito e esquerdo, tabelas com as médias de cada medida de ambos os lados dos embriões vivos foram confeccionadas (Tabelas 10-11).

Tabela 10 – Médias das medidas (mm) do lado esquerdo dos embriões vivos segundo as diferentes concentrações, tratamentos e respectivas réplicas.

Medidas (mm) do lado esquerdo nos tratamentos										
Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Cabeça		Olho		Membro superior		Membro inferior		Tronco	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
100 _{R1}	10,95	10,78	4,68	4,61	6,68	6,35	9,85	9,64	10,07	9,85
100 _{R2}	9,72	9,59	4,38	4,23	5,96	5,97	8,37	8,05	9,50	8,64
100 _{R3}	10,48	10,43	4,61	4,56	5,89	6,03	8,23	8,51	9,11	9,52
300 _{R1}	10,57	10,64	4,59	4,46	6,68	6,73	9,44	9,29	9,63	9,84
300 _{R2}	10,02	9,82	4,35	4,19	6,10	5,87	8,36	7,80	9,23	9,10
300 _{R3}	10,58	10,31	4,64	4,48	6,62	6,75	9,70	9,89	9,44	9,26
500 _{R1}	10,34	8,96	4,40	3,97	6,49	5,58	8,82	7,93	9,52	8,37
500 _{R2}	9,86	10,19	4,19	4,35	6,13	6,24	8,49	9,21	8,82	9,89
500 _{R3}	10,10	10,33	4,24	4,31	6,18	6,82	8,93	10,00	9,31	9,53
750 _{R1}	9,89	9,20	4,21	4,20	6,18	6,02	9,01	9,25	9,22	9,02
750 _{R2}	9,63	9,75	4,18	4,24	5,88	5,61	8,65	8,21	8,95	9,19
750 _{R3}	9,81	8,87	4,26	3,74	6,26	5,03	9,25	7,31	8,91	8,57

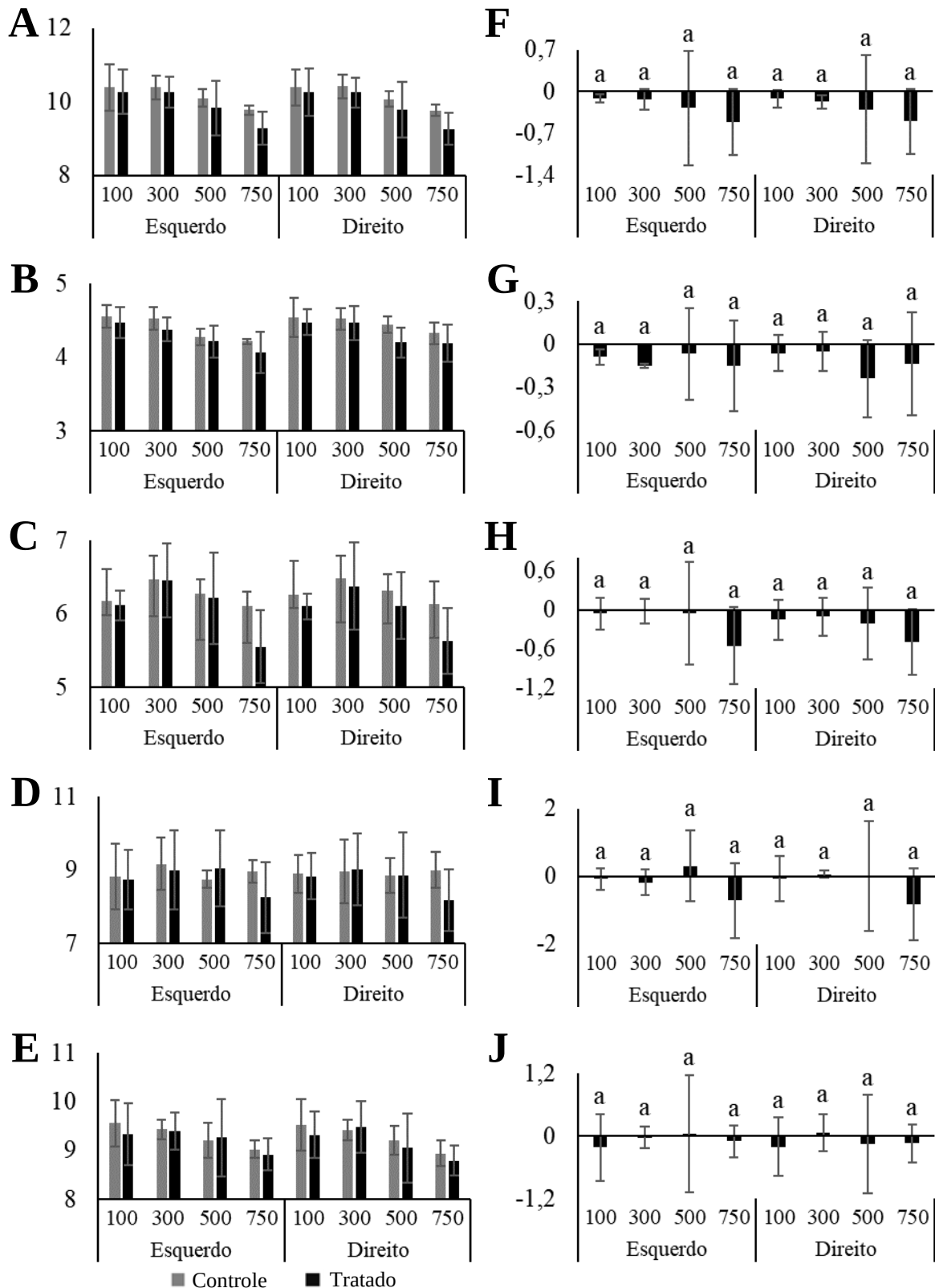
mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado; R – réplica.

Tabela 11 – Médias das medidas (mm) do lado direito dos embriões vivos segundo as diferentes concentrações, tratamentos e respectivas réplicas.

Medidas (mm) do lado direito nos tratamentos										
Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Cabeça		Olho		Membro superior		Membro inferior		Tronco	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
100 _{R1}	10,83	10,86	4,83	4,63	6,80	6,30	9,39	9,42	10,10	9,69
100 _{R2}	9,85	9,59	4,31	4,28	5,98	5,97	8,95	8,18	9,44	8,79
100 _{R3}	10,48	10,34	4,48	4,52	5,99	6,04	8,35	8,90	9,06	9,48
300 _{R1}	10,66	10,62	4,50	4,59	6,61	6,68	9,30	9,39	9,58	10,05
300 _{R2}	10,04	9,80	4,38	4,20	6,13	5,69	7,97	7,91	9,18	9,01
300 _{R3}	10,54	10,31	4,68	4,61	6,70	6,75	9,61	9,77	9,51	9,40
500 _{R1}	10,26	8,91	4,56	4,03	6,48	5,63	9,38	7,53	9,50	8,25
500 _{R2}	9,83	10,05	4,34	4,16	6,08	6,16	8,62	9,36	8,91	9,35
500 _{R3}	10,12	10,35	4,43	4,43	6,41	6,54	8,54	9,67	9,23	9,57
750 _{R1}	9,88	9,26	4,35	4,39	6,32	6,11	9,17	9,02	9,23	8,98
750 _{R2}	9,60	9,70	4,16	4,27	5,76	5,57	8,46	8,19	8,72	8,98
750 _{R3}	9,80	8,83	4,46	3,91	6,30	5,21	9,38	7,34	8,88	8,43

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado; R – réplica.

Após análise estatística, foi verificado não haver diferença significativa entre tratamentos e controles para todas as medidas (Figura 18A-E; análises estatísticas na Tabela 33 do Apêndice A), apesar de quase sempre as médias dos embriões tratados serem menores que os controles. De forma esperada, não houve alterações entre as concentrações (Figura 18F-J; análises estatísticas na Tabela 35 do Apêndice A e subtração entre a média dos tratados pelos seus respectivos controles descritos na Tabela 34 do Apêndice A). A partir desses dados, concluiu-se que os embriões vivos tratados com diferentes concentrações de Rovral® se desenvolveram de forma semelhante entre as concentrações, no que diz respeito ao tamanho das estruturas externas do corpo.



4.2.3.2 Análise da assimetria entre lados direito e esquerdo dos embriões vivos

Dando seguimento, foi verificado se os tratamentos com Rovral® resultaram em assimetria das estruturas bilaterais dos embriões vivos. Para isso, foram utilizadas as medidas citadas nas Tabelas 25-32 do Apêndice A, e foi calculada a diferença entre lado direito e esquerdo para cada uma das medidas, de cada concentração e cada tratamento, sendo esses dados expressos em módulo, ou seja, sem sinal de negativo ou positivo, uma vez que foi considerada apenas a diferença entre os lados (Tabela 36-43 do Apêndice A).

Posteriormente, foram calculadas as médias de cada réplica e tratamento (Tabela 12) para cada concentração.

Tabela 12 – Médias das assimetrias (mm) entre os lados esquerdo e direito dos embriões vivos nas diferentes concentrações, tratamentos e respectivas réplicas.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Assimetrias (mm)									
	Cabeça		Olho		Membro superior		Membro inferior		Tronco	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
100 _{R1}	0,35	0,43	0,31	0,20	0,53	0,46	0,68	0,49	0,31	0,37
100 _{R2}	0,31	0,16	0,32	0,30	0,36	0,37	0,65	0,66	0,41	0,61
100 _{R3}	0,27	0,21	0,43	0,37	0,33	0,39	0,45	0,55	0,67	0,34
300 _{R1}	0,21	0,15	0,36	0,31	0,33	0,32	0,51	0,56	0,45	0,46
300 _{R2}	0,07	0,16	0,24	0,25	0,33	0,29	0,63	0,48	0,39	0,38
300 _{R3}	0,28	0,18	0,29	0,36	0,39	0,34	0,68	0,69	0,40	0,55
500 _{R1}	0,19	0,19	0,28	0,22	0,43	0,36	0,84	0,50	0,60	0,54
500 _{R2}	0,11	0,19	0,23	0,22	0,25	0,36	0,57	0,50	0,32	0,54
500 _{R3}	0,17	0,20	0,43	0,31	0,50	0,66	0,60	0,89	0,47	0,54
750 _{R1}	0,12	0,16	0,28	0,35	0,34	0,40	0,55	0,53	0,38	0,26
750 _{R2}	0,11	0,17	0,18	0,25	0,20	0,17	0,65	0,40	0,33	0,29
750 _{R3}	0,17	0,11	0,31	0,23	0,32	0,27	0,36	0,32	0,30	0,21

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado; R – réplica.

Inicialmente, foi averiguado se houve divergência significativa entre as diferenças modulares de cada medida dos embriões tratados contra seus respectivos controles. Os testes realizados indicaram não haver diferença significativa entre os tratamentos e seus respectivos controles para todas as medidas (Figura 19A-E; Tabela 44 do Apêndice A).

Para verificar se houve diferença entre as concentrações para cada medida, foi feita a subtração entre a média dos tratados pelos seus respectivos controles (Tabela 45 do Apêndice A) e foi realizada a análise estatística para cada parte do corpo. Os testes estatísticos (Tabela 46 do Apêndice A) resultaram significativos apenas para os membros superiores ($p = 0,0497$) nas concentrações 300 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$, que diferiram entre si ($p = 0,05$). Assim, para as análises de assimetria, todas as partes do corpo analisadas demonstraram possuir simetrias semelhantes entre as concentrações, excetuando as concentrações 300 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$ para os membros superiores, que diferiram entre si (Figura 19F-J), apesar de não ter havido diferença com os controles.

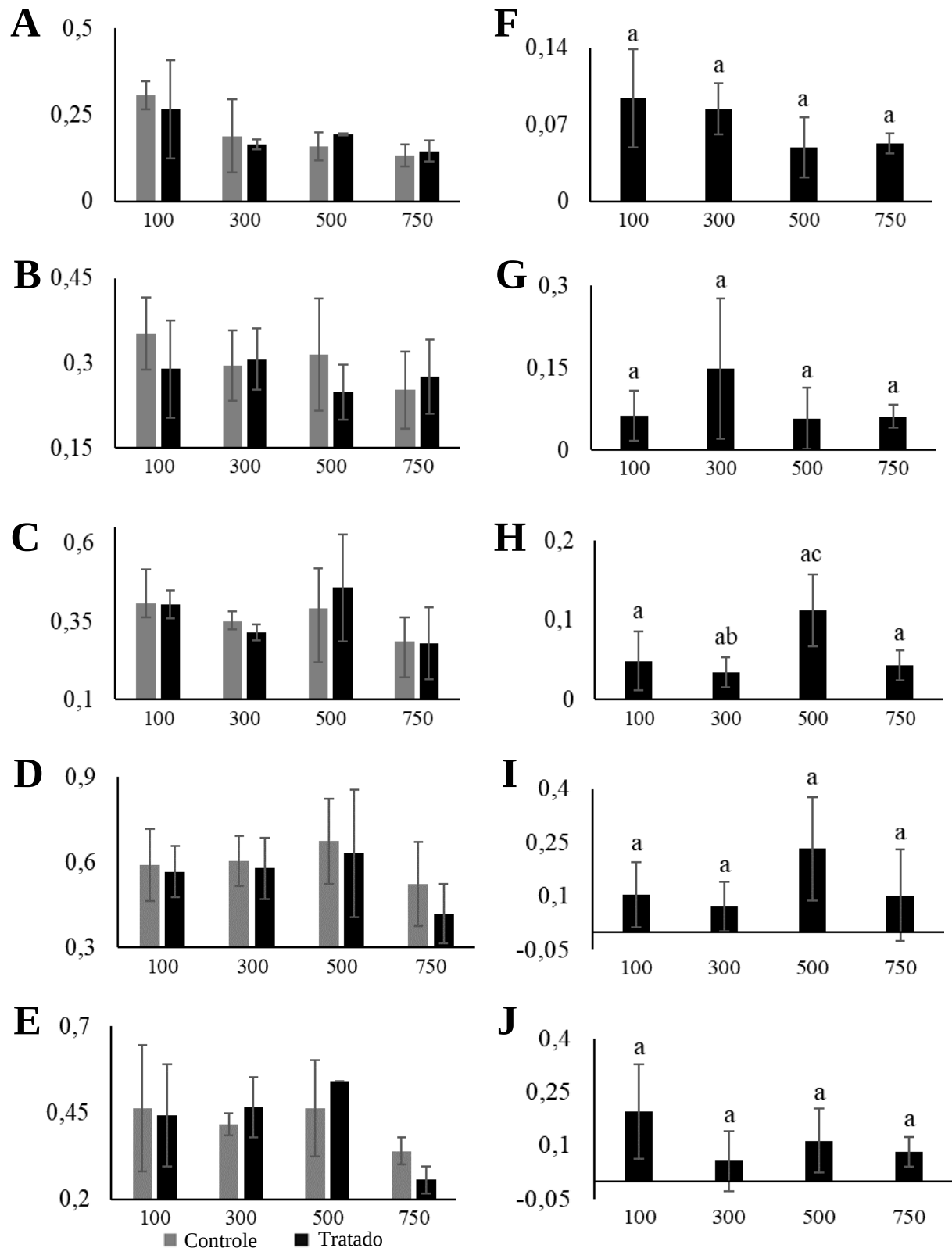


Figura 19 – Média e desvio padrão das assimetrias (mm) entre os lados esquerdo e direito dos embriões vivos. A-E – segundo as diferentes concentrações e tratamentos (testes estatísticos na Tabela 44 do Apêndice A); F-J – segundo as diferentes concentrações (testes estatísticos na Tabela 46 do Apêndice A); eixo y – medida (mm); eixo x – concentração (μL/mL). A-F – cabeça; B-G – olhos; C-H – membros superiores; D-I – membros inferiores; E-J – tronco; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.4 Análises sanguíneas

A LC_{25} foi calculada em um valor de 312 $\mu\text{L/mL}$ a partir da equação da reta encontrada. Dessa forma, tomou-se como valor de referência a concentração de 300 $\mu\text{L/mL}$ para as análises sanguíneas. Dos 32 ovos inoculados, 28 apresentaram embriões vivos passíveis de coleta sanguínea (divididos em 3 réplicas), sendo dez embriões tratados e 18 controles (Tabela 47-48 do Apêndice A).

4.2.4.1 Análise da glicemia

Os dados brutos encontrados para valores de glicemia dos embriões vivos estão apresentados nas Tabelas 47-48 do Apêndice A. Os valores da média da glicemia encontrados para cada réplica estão descritos na Tabela 13.

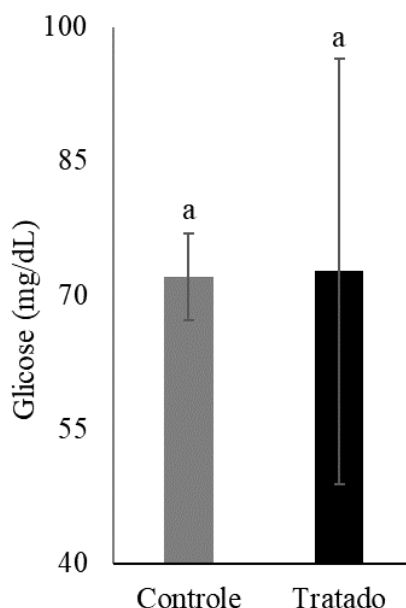
Tabela 13 - Média dos valores de glicose (mg/dL) dos embriões vivos segundo os diferentes tratamentos e réplicas na concentração da LC_{25} .

Glicose (mg/dL)		
Réplica	Controle	Tratado
1	67,17	74,50
2	72,17	95,50
3	76,83	48,00

mg/dL – miligrama/decilitro; LC – concentração letal.

A partir dessas médias, o teste estatístico indicou não haver diferença significativa entre tratados e controles para os valores de glicemia encontrados (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Média e desvio padrão dos valores de glicose (mg/dL) dos embriões vivos segundo os diferentes tratamentos na concentração da LC₂₅.



t pareado: $p = 0,0972$; mg/dL – miligrama/decilitro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

4.2.4.2 Análise de anormalidades nucleares dos eritrócitos

Os dados brutos encontrados para anormalidades nos eritrócitos estão apresentados nas Tabelas 49-50 do Apêndice A. Nestas tabelas, as lâminas cuja má coloração impediu a contabilização não aparecem nos dados. Para cada embrião vivo ($n = 28$), foram preparadas três lâminas contabilizadas como subréplicas, totalizando 54 lâminas controles e 30 lâminas de embriões tratados, provenientes das três réplicas realizadas. Entretanto, devido à má qualidade de coloração adquirida por algumas lâminas, foram analisadas 27 lâminas de embriões tratados e 50 lâminas de embriões controles, provenientes de 28 embriões.

Foram calculadas as médias dos números de anormalidades nucleares entre cada uma das três réplicas, utilizando os números de subréplicas disponíveis, conforme descrito nas Tabelas 51-53 do Apêndice A. Nestas tabelas, as lâminas cuja má coloração impediu a contabilização aparecem sem dados. Por fim, para a análise, foi preparada uma tabela contendo as médias das anormalidades para as três réplicas (Tabela 14).

A partir das médias da Tabela 14, os testes indicaram diferença significativa entre embriões tratados e controles apenas para a anormalidade binucleada, enquanto, para as demais anormalidades nucleares, não houve diferença significativa entre tratados e controles (Figura 20).

Tabela 14 – Média do número das anormalidades dos eritrócitos dos embriões vivos segundo os tratamentos e respectivas réplicas na concentração da LC₂₅.

Controle							Tratado						
Réplica	MN	BN	LB	BL	BD	NT	MN	BN	LB	BL	BD	NT	
1	0,78	0,28	22,00	0,00	10,83	2,00	1,75	0,92	30,25	0,00	12,17	2,25	
2	0,67	0,25	45,11	0,11	13,22	3,44	1,38	0,71	34,08	0,00	12,13	2,29	
3	1,56	0,58	36,69	0,11	12,94	1,08	0,67	1,50	30,50	0,00	13,50	3,17	

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*.

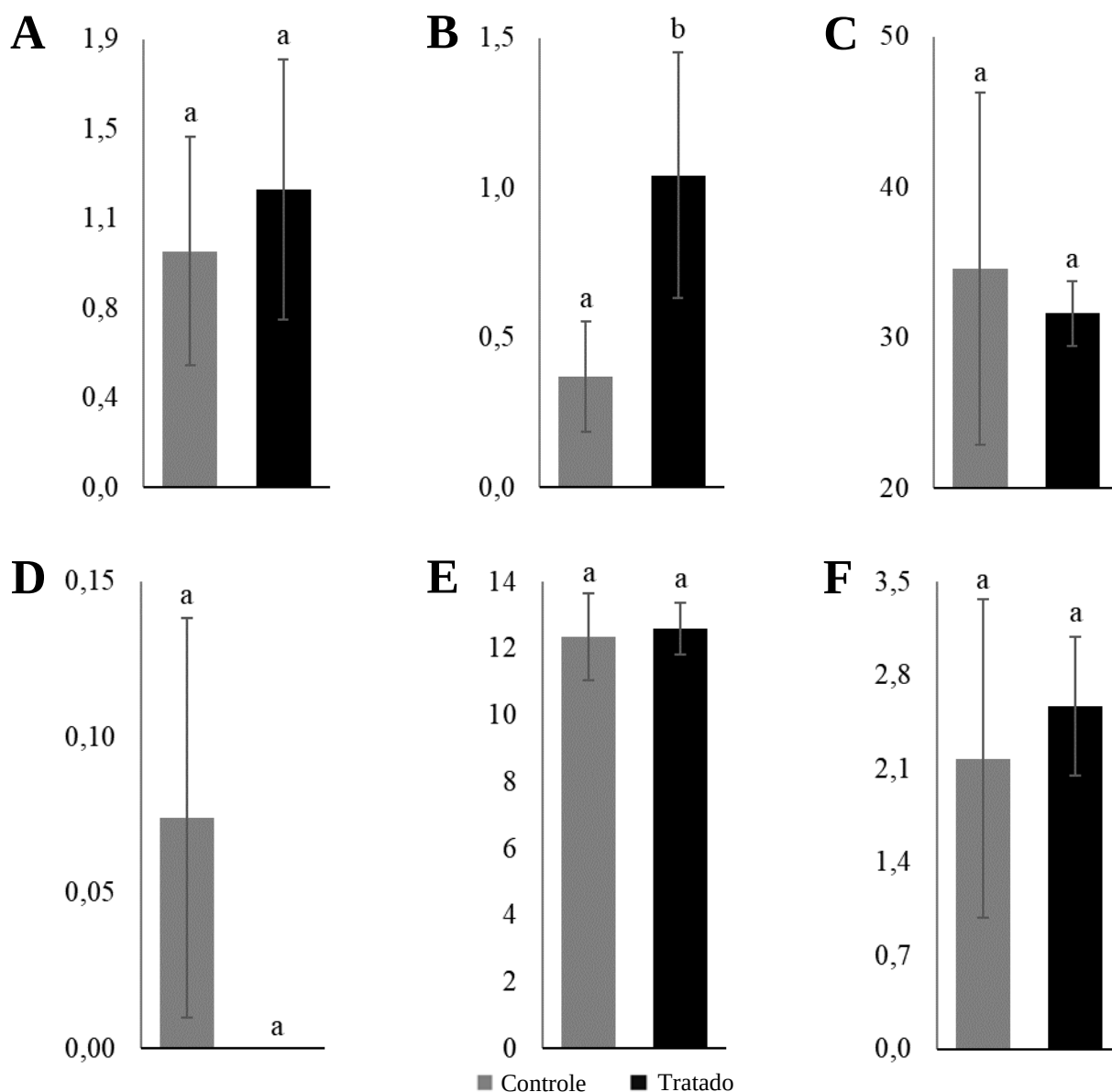


Figura 20 – Gráficos das médias das anormalidades dos eritrócitos dos embriões vivos segundo os tratamentos na concentração da LC₂₅. A – micronúcleo (t pareado: $p = 0,6950$); B – binucleado (t pareado: $p = 0,0373$); C – lobado (t pareado: $p = 0,6570$); D – bilobado (Wilcoxon: $p = 0,1573$); E – bud (t pareado: $p = 0,7317$); F – notched (t pareado: $p = 0,7135$); as colunas com as mesmas letras do alfabeto não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O uso de praguicidas pelos humanos tem origem antiga. O primeiro produto utilizado como pesticida é datado de 4500 anos atrás, com o pó de enxofre usado na antiga Suméria, Mesopotâmia. Adiante, no século XV, arsênico, mercúrio e chumbo foram utilizados contra pragas em culturas. E, no século XVII, das folhas do tabaco foi extraído o sulfato de nicotina, também utilizado como inseticida (Larramendy & Soloneski, 2012).

No século passado, com o aumento populacional, houve a necessidade de aumentar a produtividade agrícola. Segundo a FAO (2017), a produção agrícola mais que triplicou entre 1960 e 2015, e, acompanhando este crescimento, houve um aumento na propagação de pragas e patógenos nas culturas entre 1950 e 2000. Assim, foi necessária a intensificação do uso de pesticidas para melhorar e proteger as culturas, tendo havido um crescimento mundial de 70,8% no uso médio de pesticidas por área de terra cultivada de 1990 (1,54 kg/ha) a 2017 (2,63 kg/ha) (FAOSTAT, 2019b). Essa intensificação levou ao aparecimento de diversos efeitos negativos em várias espécies não-alvo, como por exemplo, a perda de riqueza de invertebrados em países da Europa e Austrália (Beketov et al., 2013), diminuição do tamanho e do peso corporal, assim como diminuição de esplenócitos e sua atividade fagocítica em sapos (Christin et al., 2013), e uma possível contribuição para aparecimento de displasia facial em chimpanzés e babuínos (Krief et al., 2017). Adicionalmente, foi relatada associação entre exposição residencial materna a pesticidas agrícolas e defeitos congênitos cardíacos, gastrointestinais e urogenitais em seres humanos (Rappazzo et al., 2016).

Com o aumento do uso de agrotóxicos, pessoas que trabalham com esses químicos também foram afetadas, ocasionando efeitos deletérios na saúde (OMS, 1992). Adicionalmente, a contaminação ocupacional já foi relacionada a casos de abortamento e malformação fetal (Ueker et al., 2016; Qomariyah et al., 2019). A contaminação por agrotóxicos não é restrita apenas aos trabalhadores em contato com estes químicos. Familiares também são contaminados através do transporte dos agroquímicos pelo veículo, roupas e pele dos trabalhadores (Curl et al., 2002). Por esses motivos, é de extrema relevância o estudo aprofundado dos potenciais efeitos que os agrotóxicos podem exercer sobre os organismos vivos.

No presente trabalho, buscamos analisar os efeitos do Rovral®, fungicida cujo princípio ativo é o iprodiona, sobre o desenvolvimento embrionário, utilizando como

modelo o embrião de galinha, um animal amplamente utilizado em estudos de embriologia pela sua praticidade de aquisição/manutenção e sua proximidade filogenética com os mamíferos.

5.1 CONTROLE NEGATIVO

Diversos trabalhos utilizam o termo “veículo” para designar a substância na qual o agrotóxico será diluído. Alguns agrotóxicos não são solúveis em água e precisam de outra substância para diluição, como é o caso do inseticida flufenoxuron que precisa ser diluído em acetona (Rachid et al., 2008). Por outro lado, alguns veículos também apresentam alta toxicidade, como é o caso do DMSO (dimetilsulfóxido) para o peixe *Micropterus salmoides*, sendo necessária a utilização de um veículo que apresente mais baixa toxicidade (Blum et al., 2008). No presente trabalho, inicialmente foi testado se o uso de água deionizada autoclavada seria confiável como um controle negativo para os experimentos de contaminação aguda. O uso de água como controle foi reportado em diversos estudos que testaram os efeitos de agrotóxicos sobre organismos vivos (Khalil & El-Daway, 2000; Várnagy et al., 2001; Patel & Bhatt, 2013; Sardar et al., 2020). Adicionalmente, outros veículos foram utilizados, como a trioleína (Blankenship et al., 2003), o etanol (Pal et al., 2005), o propilenoglicol (Matsushita et al., 2006), acetona misturada em água (Petrovová et al., 2010), a metilcelulose, o óleo de milho (Uggini et al., 2012), o óleo de amendoim (Sechman et al., 2011), solução salina (Kmecick et al., 2019) e o DMSO (Gobeli et al., 2017). Como os ensaios realizados no presente trabalho utilizando água deionizada autoclavada como veículo demonstraram não haver interferência causada pela água, e sendo este composto de fácil aquisição e estocagem, optamos por utilizá-lo como controle negativo para todos os experimentos, além de veículo de diluição do agrotóxico. O controle negativo com água foi empregado em todos os experimentos e réplicas realizadas, com o intuito de minimizar os efeitos de lotes de ovos, sazonalidade, animais em postura, entre outros.

5.2 TRATAMENTO AGUDO

O método da injeção única diretamente na câmara de ar do ovo é bem estabelecido e produz resultados confiáveis, sendo utilizado desde a década de 1960 (McLaughlin et al., 1963; Dunachie & Fletcher, 1969). Diversos experimentos de embriotoxicidade em ovos de aves utilizaram da injeção única de solução contaminada na câmara de ar do ovo para testar, por exemplo, os efeitos dos inseticidas malation, endosulfan (Pourmirza, 2000), imidacloprida (Singh et al., 2015), dimetoato + metidation (Alhifi, 2018), e

compostos mais gerais, como o ácido perfluorooctanóico (PFOA) e cádmio (Kmecick et al., 2019) em galinhas. Outras formas de aplicação também foram desenvolvidas, como a pulverização em campo de ninhos de *Sialia sialis* e *Tachycineta bicolor* localizados em árvores e pasto de gado (Mayne et al., 2004), a aplicação diretamente sob o blastodisco (Aluigi et al., 2005) e a imersão dos ovos em água destilada (Mathur et al., 2013). Considerando que a técnica de injeção na câmara de ar do ovo é de fácil execução e simula de forma eficiente o contato de organismos amniotos com compostos químicos, decidimos utilizá-la no presente trabalho.

A quantidade de solução injetada para testes de toxicidade aguda também é variável conforme o estudo, podendo ser de volume fixo, como a aplicação de solução nos volumes de 20 µL (Halldin et al., 2003), 25 µL (Kamata et al., 2010), 0,1 mL (Asmatullah et al., 2002) ou 1 mL (Chowdhury et al., 2014) por ovo, ou variável conforme o peso do ovo, tendo sido utilizados valores de 0,1 µL/g (Henshel et al., 1997), 1 µL/g (DeWitt et al., 2005) e 0,1 mL/g do ovo (Hashizume et al., 1992). Nos ensaios piloto, descritos no item 3.2 dos Materiais e Métodos, foi utilizado o volume de 1 µL/g de ovo injetado, e esta se mostrou uma metodologia com baixa mortalidade dos controles e funcional para os tratamentos com agrotóxicos.

Assim, com base na análise literária e ensaios pilotos, optamos por utilizar a injeção única na câmara de ar do ovo com volume variável dependendo do peso do ovo (1 µL/g), além de deixá-lo na vertical por um período para que a concentração fosse absorvida e transpassasse a membrana em direção à gema.

De forma complementar, o tratamento crônico, através de diversas injeções em concentrações mais baixas do agrotóxico, seria interessante para experimentos posteriores em laboratório, pois seriam obtidas mais informações acerca da aplicação repetida do agrotóxico, tornando o experimento mais próximo da contaminação ambiental.

5.3 LC₅₀ DO FUNGICIDA ROVRAL® PARA EMBRIÕES DE GALINHA

As substâncias químicas, como os agrotóxicos, causam consequências tóxicas diversas na saúde e o efeito da dosagem ou concentração é característico para órgãos e espécies específicas. Para comparar esses efeitos entre os diferentes produtos químicos e entre espécies, realizam-se testes de letalidade. O uso da dose letal (ou, alternativamente, da concentração letal) foi inicialmente utilizado por John William Trevan para drogas farmacológicas.

Posteriormente, essa avaliação toxicológica foi utilizada para outros químicos, como os agrotóxicos. Uma das medidas comumente empregadas é a de concentração letal média, ou LC_{50} , definida como a concentração que mata metade de uma amostra (Trevan, 1927; CCOHS, 2018; OECD, 2018).

No presente trabalho, foi estimado o valor da LC_{50} para o fungicida Rovral® em embriões de galinha através de um cálculo de equação da reta, em 738 $\mu\text{L/mL}$, equivalendo a 492 vezes a concentração recomendada para uso. Experimentalmente, em um estudo piloto com embriões de galinha, a LC_{50} experimental foi estimada em aproximadamente 100 $\mu\text{L/mL}$, correspondente a 67 vezes a dose recomendada para uso (1,5 $\mu\text{L/mL}$) (Arcain, 2017), apesar de não terem sido realizadas réplicas para melhor análise dos dados. Já no trabalho de conclusão de curso de Rossoni (2019), o tratamento por injeção única com 100 μL de solução de Rovral® em concentração de 1,5 $\mu\text{L/mL}$ resultou em 43% de mortalidade, porcentagem muito superior ao encontrado no presente trabalho. Entretanto, além de não ter realizado réplicas experimentais, pode-se observar que Rossoni (2019) encontrou também altas taxas de mortalidade para os seus controles, chegando a 20% para o controle fechado (sem nenhuma intervenção), o que demonstra que essa porcentagem não corresponde com a real letalidade do produto, sendo resultado de outros efeitos que afetaram inclusive os grupos controle. A utilização de controles individuais para cada experimento, conforme realizado no presente trabalho, ajuda a eliminar o efeito de outros fatores que podem contribuir para aumento das taxas de mortalidade. Adicionalmente, a realização de triplicatas realizadas em experimentos individuais fortalece a veracidade dos dados encontrados no presente trabalho.

Experimentalmente não foi possível alcançar o valor calculado no presente trabalho para a LC_{50} , pois a mortalidade para essa concentração não apresentou o crescimento esperado. Atribuímos este fato à alta viscosidade do produto, já que a solução diluída continha aproximadamente 75% do produto comercial para apenas 25% de água. É possível que no momento do preparo da amostra e/ou da sua aplicação, não tenha sido possível realizar a pipetagem com a precisão necessária, em função da alta viscosidade do produto, que se adere à ponteira de plástico. Adicionalmente, pode-se especular que esta viscosidade tenha alterado a forma de absorção da solução por parte dos embriões, não tendo sido permeável da mesma maneira às membranas do ovo. Conforme descrito na sessão 4.2.1 dos Resultados, os valores de mortalidade para a concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$ foram inferiores aos encontrados para as concentrações de 300 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$, claramente indo contra a tendência de crescimento da porcentagem de mortalidade observada para as concentrações menores. De forma

semelhante, Nitu et al. (2012), em seu trabalho de imersão de ovos de galinha em soluções do acaricida organoclorado dicofol, também encontraram uma diminuição na mortalidade na mais alta concentração. Essa discrepância na mortalidade é denominada “outlier”, ou seja, são valores incomuns ou apenas erros. Neste caso, os valores não podem ser corrigidos, sendo possível sua retirada da análise para melhorar a leitura dos dados (De Veaux et al., 2018). Desta forma, os valores de mortalidade para o teste com a concentração 750 µL/mL foram excluídos das análises, e, a partir das demais concentrações obteve-se o valor de 738 µL/mL para a LC₅₀ do fungicida Rovral® para embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento. Por ser um valor bastante elevado, este resultado indica que o agrotóxico possui baixo potencial de letalidade, nas condições do experimento.

5.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

5.4.1 Análise de malformações ocasionadas pelo Rovral® em embriões de galinha

Efeitos negativos dos agrotóxicos sobre o desenvolvimento embrionário podem aparecer na forma de malformações. Neste trabalho, para efeito de análise de porcentagem, apenas os embriões vivos foram considerados. Os tratamentos com Rovral® não foram significativos em relação aos controles, indicando que os tratamentos não interferem nas taxas de malformações, assim como reportado, por exemplo, por estudos com exposição de embriões de *Xenopus laevis* ao fungicida triadimefon (Lenkowski et al., 2010) e em embriões de peixes-zebra tratados com o fungicida penconazol (Aksakal & Ciltas, 2018). Entretanto, ressalta-se que malformações foram encontradas também em embriões mortos, não sendo possível determinar se elas foram responsáveis pela morte destes embriões. Para fins de análise, essas malformações não foram contabilizadas, pois o interesse do estudo foi verificar se os embriões que conseguiram sobreviver ao tratamento tiveram algum tipo de sequela que pudesse afetar sua vida futura. Adicionalmente, apesar de não estatisticamente significativo, o aparecimento de malformações em diversos embriões vivos representa riscos ao restante do desenvolvimento do animal e sua vida futura.

Os embriões testados durante os experimentos com o Rovral®, tanto vivos como mortos, apresentaram, em sua maioria, malformações cefálicas/craniais, oculares, hemorrágicas e no tronco. Os defeitos na região cefálica foram principalmente de ausência do bico, formação incompleta da própria cabeça e microftalmia. As hemorragias ocorreram tanto

nas laterais do corpo, como órgãos e cabeça. Para o tronco, foram observados órgãos internos aparentemente protuberantes e coração ectópico. De forma semelhante, o tratamento com Rovral® causou em embriões vivos malformações encefálicas, oculares, no tronco (coração anormal) e hemorrágicas (Arcain, 2017; Rossoni, 2019). A seguir discutiremos os efeitos que estas malformações podem acarretar para o animal.

5.4.1.1 Malformações craniais

Durante o processo de neurulação, ocorre uma indução no ectoderma central pela notocorda através de anti-BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*), tornando-o mais espesso e formando a placa neural. Posteriormente, a ectoderme nas bordas laterais da placa se dobra formando as pregas neurais, que se elevam até se fecharem formando o tubo neural, que originará o cérebro e a medula espinhal e marcando o final da neurulação (Figura 21) (Schoenwolf, 2018). O tubo neural se fecha do centro para as extremidades e a falha em seu fechamento pode causar defeitos no tubo neural. Esses defeitos podem estar relacionados com a interrupção da via não canônica/polaridade celular planar (PCP), responsável pela extensão convergente que modela a placa neural e resulta na fusão da linha média, e perturbação da via canônica/ β -catenina que regula o fator de transcrição Pax3 (*Paired box gene 3*), expresso nas pregas neurais dorsais e envolvido no fechamento do tubo (Nikolopoulou et al., 2017). Quase que simultaneamente, ocorrem os dobramentos embrionários, que transformam o embrião trilaminar, contendo a ectoderme na região superior, a endoderme na inferior, e entre elas a mesoderme, em um embrião tubular, completamente recoberto por ectoderme externamente, contendo um tubo digestivo revestido internamente por endoderme, e um recheio de mesoderme entre esses dois tecidos (Gilbert & Barresi, 2016).

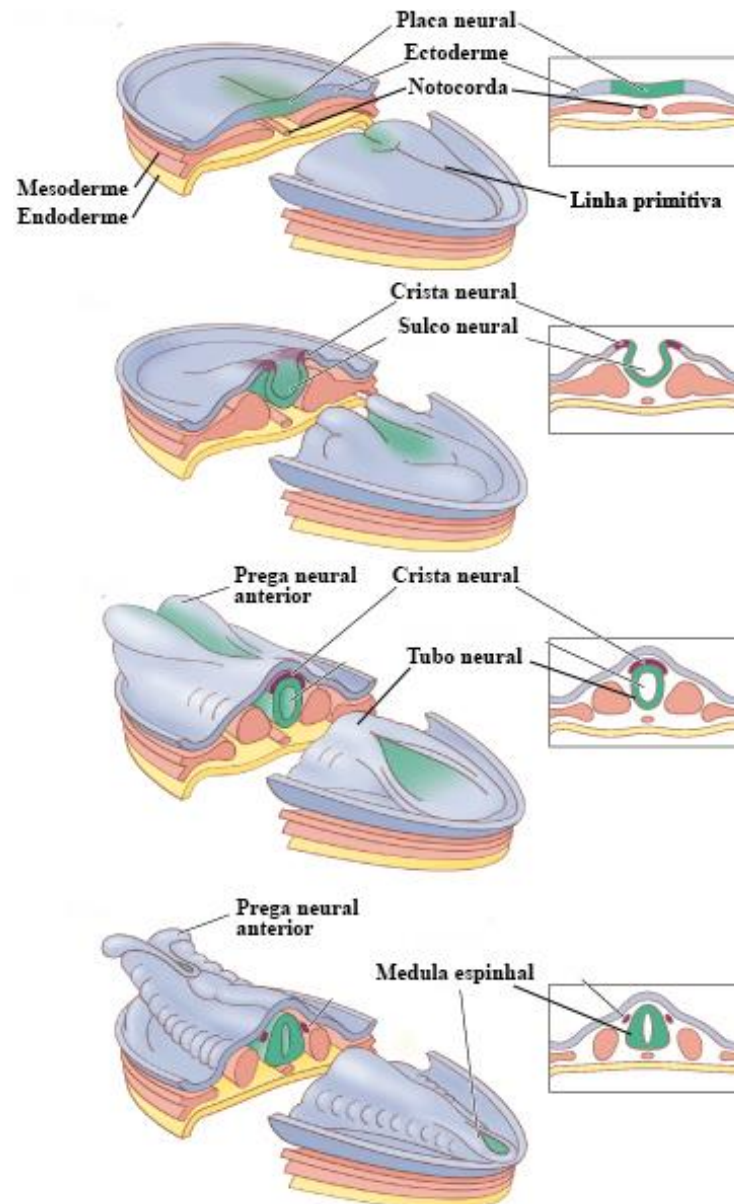


Figura 21 – Processo de neurulação. A – na região da faixa primitiva, a notocorda se forma por invaginação da mesoderme. B – a placa neural se dobra, formando o sulco neural e posteriormente o tubo neural. C – as bordas da placa neural se encontram e o tubo neural começa a fechar do centro para as extremidades. D – o tubo neural se torna a medula espinhal e a extremidade anterior da dobra neural continua a se expandir, formando o cérebro. **Fonte:** Purves et al., 2001 (modificado).

A partir das extremidades das dobras do tubo neural, desprendem-se células, chamadas células da crista neural, que migrarão para diversas regiões do corpo e dar origem a uma diversidade de tecidos (Figura 22) (Bronner, 2012). Na região rostral, essas células contêm informações iniciais para a padronização craniofacial e respondem a outras influências para formar as estruturas da face e pescoço. As células da crista neural migram para a região ventral da cabeça, preenchendo os arcos faríngeos e contribuindo para a formação do esqueleto, de melanócitos, tecido conjuntivo, músculo liso, fáscia e partes do sistema nervoso periférico da face e pescoço (Creuzet et al., 2005).

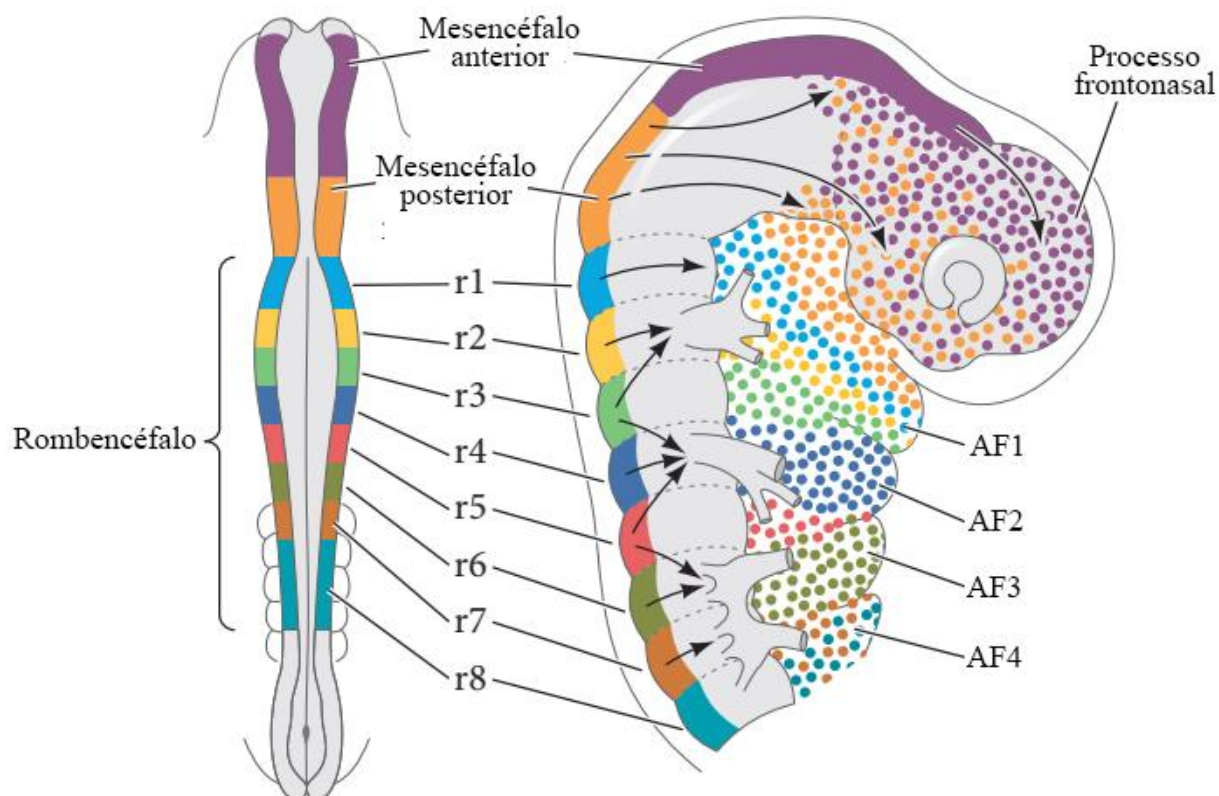


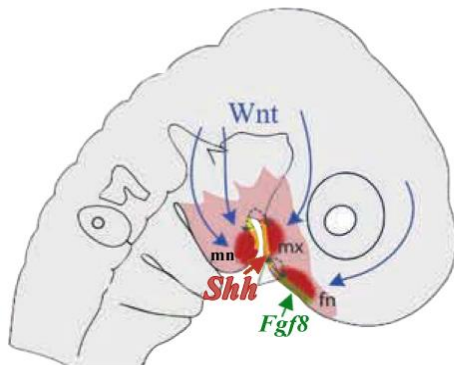
Figura 22 – Migração das células da crista neural após se desprenderem das extremidades do tubo neural. r – rombômero; AF – arco faríngeo. **Fonte:** Gilbert & Barresi, 2016 (modificado).

Distúrbios nos processos descritos acima, desde o fechamento do tubo neural, até a migração das células da crista neural, podem levar a anormalidades craniais de diversos tipos. Alguns estudos já reportaram o aparecimento de malformações craniais em função da contaminação com agrotóxicos, de maneira semelhante ao observado no presente trabalho. Embriões do anfíbio *Rhinella arenarum*, por exemplo, apresentaram microcefalia quando tratados com o herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (Aronzon et al., 2011) ou com o inseticida cipermetrina (Svartz et al., 2016b). Embriões de galinha testados com o inseticida Decis® (composto ativo deltametrina) apresentaram, além de microcefalia, também exencefalia (Bhaskar et al., 2016), demonstrando que o uso indiscriminado destes compostos pode resultar em alterações faciais e craniais relevantes para os organismos, podendo até ser fatal para o desenvolvimento embrionário.

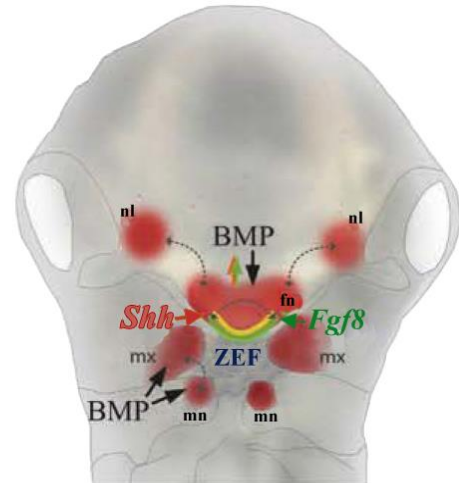
A migração de células no início do processo da cabeça tem papel no desenvolvimento dos bicos das aves. As células da crista neural, que estão localizadas numa posição mais anterior, migram sobre o prosencéfalo e ao redor das vesículas ópticas, formando os processos maxilares e mandibulares e o processo frontonasal. Os processos mandibulares formarão o bico inferior. A união dos processos maxilar, frontonasal e latero-nasal forma o bico

superior enquanto o mesênquima frontonasal forma a cartilagem pré-nasal e o osso pré-maxilar (Bellairs & Osmond, 2014; Gilbert & Barresi, 2016). A cartilagem pré-nasal estabelece a morfologia do bico através da regulação coordenada de sinais de BMP e Calmodulina, que controlam, respectivamente, a largura e profundidade do bico e o seu comprimento, gerando diferentes tipos de bicos nas diferentes espécies de aves. As moléculas TGF β IIr (*Transforming growth factor β type II receptor*), β -catenina e Dkk3 (*Dickkopf-related protein 3*) também desempenham papel no desenvolvimento do osso pré-maxilar (Mallarino et al., 2011). Adicionalmente, o ácido retinóico auxilia a manter um gradiente de expressão do *Fgf8* (*Fibroblast growth factor 8*) e do *Shh* (*Sonic hedgehog*). A expressão de *Shh* na região denominada zona ectodérmica frontonasal, o centro de sinalização ectodérmico que recobre o processo frontonasal, em conjunto com a expressão do *Fgf8*, regula o crescimento do bico superior (Minoux & Rijli, 2010). Esses processos podem ser observados nas Figura 23 e 24.

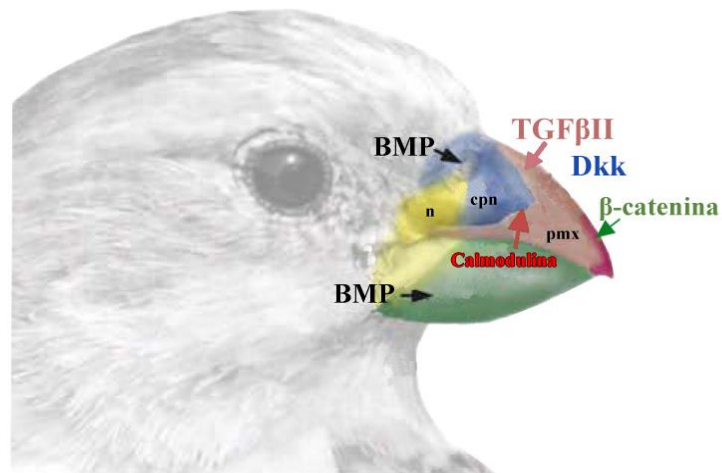
O encurtamento do bico apresentado no presente trabalho também foi observado em embriões de galinha testados com os inseticidas imidacloprida (Hussein et al., 2014), diclorvós (Roongruangchai et al., 2018a) e indoxacarb (Abbas et al., 2019). Segundo Schneider et al. (2001), a inibição do ácido retinóico, do *Fgf8* ou do *Shh* acarreta apoptose celular e redução da proliferação celular, suprimindo o processo frontonasal e interferindo nos processos maxilares, levando à redução do bico superior. O bico superior também pode ter seu comprimento reduzido caso os níveis de Calmodulina estejam baixos (Abzhanov et al., 2006). Pode-se especular que o Rovral® também interfere nessas vias de sinalização, levando à anormalidades no processo de formação do bico. Alterações deste tipo podem resultar em bicos ineficientes para a captura do alimento, redução da taxa de crescimento e comportamentos anormais, levando o animal à morte (Bai et al., 2014).



Migração celular para a posição das proeminências do bico



Crescimento e limites das proeminências



Diferenciação e afinamento do bico

Figura 23 – Morfogênese do bico. As proeminências faciais (mostradas em vermelho), são formadas a partir da migração de células da crista neural que se agregam, formando as regiões frontonasal (fn), nasal lateral (nl), mandibular (mn) e maxilar (mx). Posteriormente, durante o desenvolvimento, surgem a cartilagem pré-nasal (cpn), osso pré-maxilar (pmx) e o osso nasal (n). Setas de duas pontas mostram interações entre proeminências vizinhas durante o crescimento e expansão. ZEF – zona ectodérmica frontonasal. **Fonte:** Badyaev, 2011 (modificado).

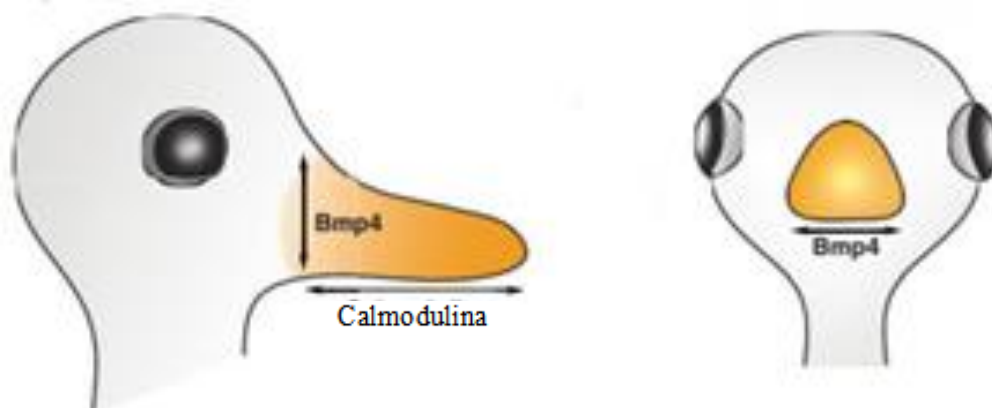


Figura 24 – Sinalização que regula a formação e forma do bico superior, determinando a largura (*Bmp4*) e profundidade (calmodulina). **Fonte:** Minoux & Rijli, 2010 (modificado).

5.4.1.2 Malformações oculares

O desenvolvimento ocular (Figura 25) se inicia a partir de uma cascata de sinalizações entre ectoderme de revestimento e ectoderme neural do diencéfalo, que forma a vesícula óptica. Esta entra em contato com a ectoderme adjacente, cujas células engrossam e formam o placóide da lente, que invagina e forma a vesícula da lente. Enquanto isso, a vesícula óptica também invagina e forma o cálice óptico. Posteriormente, as células da vesícula óptica que tocam a ectoderme se diferenciam em retina neural em resposta à sinalização por *Vsx2* (*Visual system homeobox 2*), enquanto as células adjacentes se diferenciam em retina pigmentada, em resposta ao *Mitf* (*Microphthalmia-associated transcription factor*). Todo este processo tem início na parte anterior do tubo neural, onde as vias BMPs são inibidas pela expressão do gene *Noggin* (Faure et al., 2002), o que resulta na ativação de *Pax6* no campo ocular presuntivo, através de uma complexa cascata de sinalização que finalmente gera o campo de formação dos olhos no centro do prosencéfalo ventral (Zuber et al., 2003). Posteriormente, o campo ocular é suprimido pelos sinais do *Shh* emanados da linha mediana rostral, o que resulta na divisão do campo ocular em dois (Zhang & Yang, 2001).

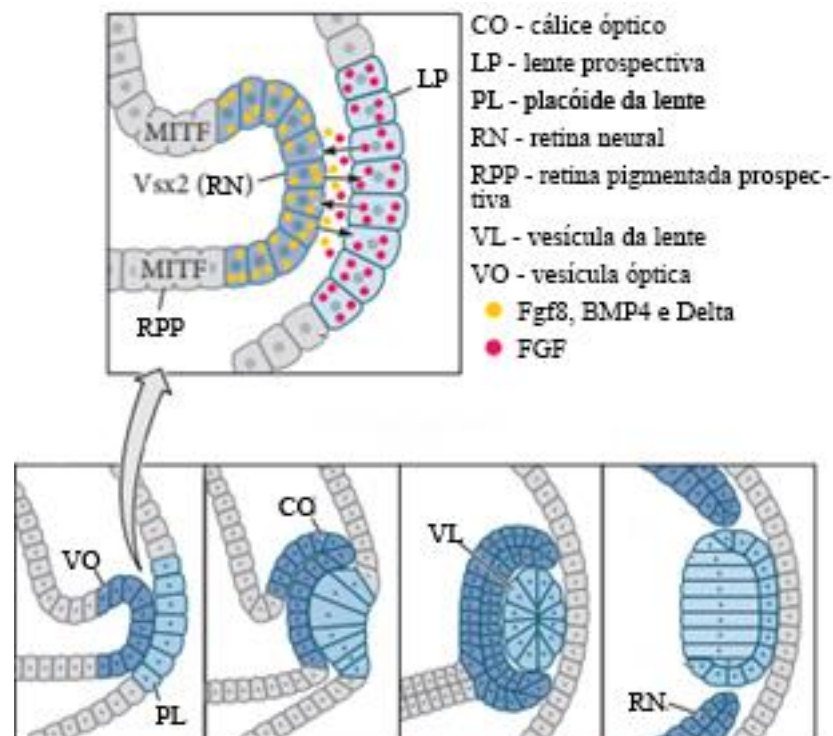


Figura 25 – Processo de formação do olho. **Fonte:** Gilbert & Barresi, 2016 (modificado).

Os resultados dos ensaios com contaminação por Rovral® encontrados neste trabalho demonstraram que este composto químico pode interferir com a complexa via de sinalizações que leva à formação dos olhos, levando à anaftalmia. Casos de microftalmia já foram reportados por outros autores em outras espécies, como, por exemplo, em embriões de rã-verde (*Pelophylax perezi*) tratados com o herbicida S-metolaclopro (Quintaneiro et al., 2018), em peixes, como em *Channa punctatus* tratados com o inseticida clorpirifós (Mishra & Devi, 2014) e em *Danio rerio* tratados com o inseticida quinalfos (Yashwanth et al., 2016). Os embriões concebidos de ratas tratadas com o inseticida ciflutrina também apresentaram microftalmia (Soni et al., 2011), assim como embriões de galinha testados com o inseticida dimetoato (Sabir et al., 2015). Além da microftalmia, também houve casos de ciclopia, reportados em embriões de *Oryzias latipes* tratados com o herbicida diquate e dimetenamida (Castaño et al., 2000), e em embriões de *Xenopus laevis* tratados com o herbicida glifosato (Paganelli et al., 2010).

É sabido que a superexpressão de *Noggin* leva a microftalmia ou anaftalmia (Adler & Belecky-Adams, 2002). Adicionalmente, caso a expressão do *Shh* não ocorra adequadamente, o campo não se divide, ocasionando ciclopia (Mercier et al., 2013), como ocorreu em alguns casos nos experimentos do presente trabalho. Porém, se houver uma superexpressão de *Shh* sintetizado pela placa pré-cordal, o *Pax6* é suprimido, resultando na ausência da formação dos olhos (Gilbert & Barresi, 2016). A malformação ocular acarreta problemas a diversas atividades das aves, como voar, procurar e adquirir alimento, encontrar locais para nidificação, atividades paternais e comportamentos reprodutivos (Alonso et al., 2004; Tyrrell et al., 2013; Martin, 2014). Experimentos adicionais serão necessários para demonstrar de que maneira o Rovral® interfere com as vias de sinalização que levam à formação dos olhos.

5.4.1.3 Malformações no tronco

Dentre as malformações mais comuns observadas nos embriões tratados com Rovral® estão as alterações no tronco, onde órgãos aparecem externamente à cavidade torácica/abdominal, incluindo o coração. Os trabalhos de Andleeb et al. (2014) com o inseticida malation, Mobarak & Al-Asmari (2011) com o inseticida endosulfan e Roongruangchai et al. (2018b) com o herbicida glifosato, testados em embriões de galinha, também mostraram ocorrência de coração exposto. Essa exposição ocorre devido a falhas na progressão das dobras

laterais durante o dobramento lateral embrionário (Figura 26). Durante esse processo, as células mesodérmicas dos somitos se tornam células mesenquimais e se diferenciam em células precursoras ósseas, musculares e dérmicas (Sadler & Feldkamp, 2008). Algumas das células das regiões do esclerótomo e do miótomo migram para a camada parietal da mesoderme da placa lateral, auxiliando nas dobras laterais. A falha nessa diferenciação e migração pode causar o fechamento incorreto da caixa torácica, deixando o coração exposto, uma condição conhecida como *ectopia cordis*, assim como observado no presente estudo. A falha do correto fechamento da parede do corpo também pode resultar em gastrosquise, onfalocele e extrofia da bexiga (Sadler, 2010). Essas alterações são incompatíveis com a vida (D'Souza et al., 2004) e, em mamíferos não humanos, recém-nascidos com defeitos no fechamento do corpo são canibalizados pelas mães (Williams, 2008).

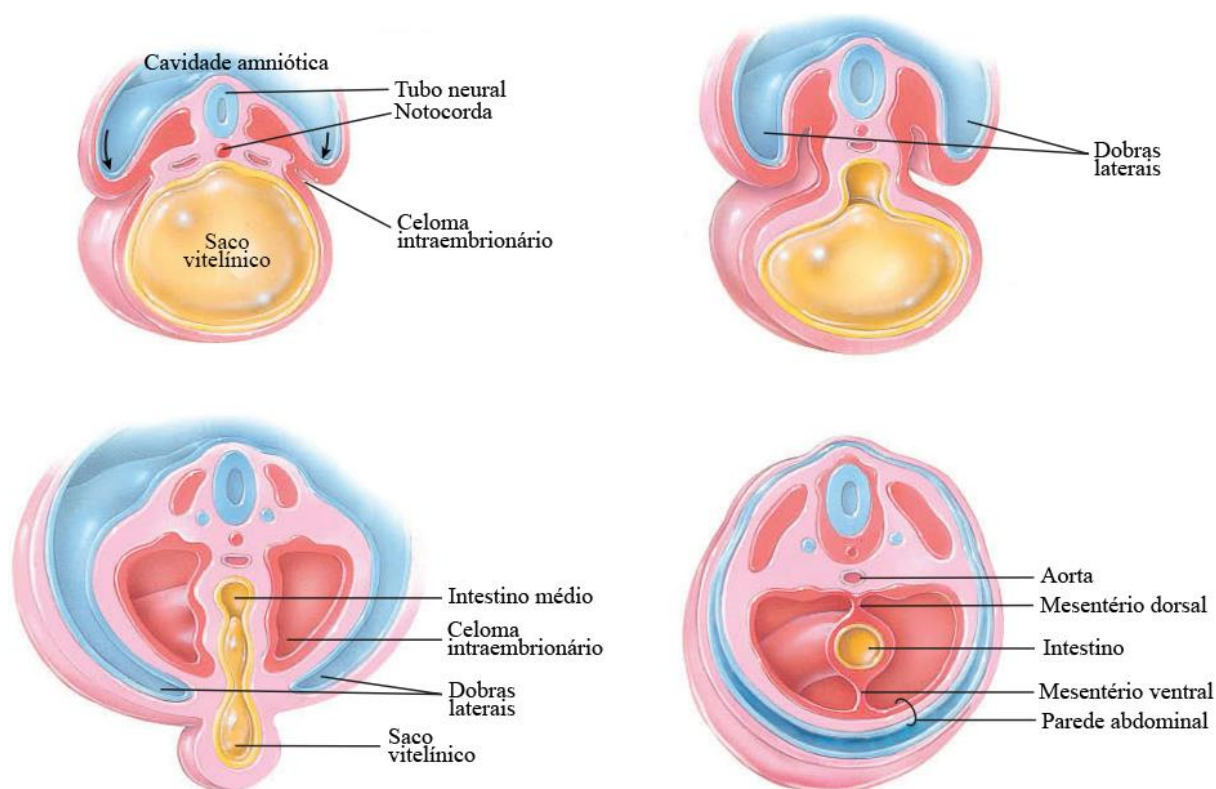


Figura 26 – Dobramento lateral do corpo. **Fonte:** Tortora & Derrickson, 2014 (modificado).

5.4.1.4 Hemorragias

Para levar sangue bombeado pelo coração para as outras partes do corpo, é necessário que o sistema cardiovascular se forme adequadamente. No desenvolvimento embrionário, os vasos sanguíneos são formados pelos processos de vasculogênese e angiogênese (Figura 27). Na vasculogênese novos vasos são formados a partir de células

precursoras, enquanto na angiogênese novos vasos são formados a partir de vasos pré-existent, por brotamento e ramificação (Moore et al., 2016).

No início da vasculogênese, os sinais BMP, Wnt e Notch ativam o fator de transcrição Etv2 (*E-twenty six-variant*) nas células mesodérmicas da placa lateral, convertendo o epitélio em hemangioblastos das ilhas de sangue do saco vitelino. Através da indução do FGF2, ocorre o desenvolvimento das ilhas de sangue, formadas pelos agregados hemangioblásticos. Nessas ilhas, as células periféricas se tornam endoteliais e revestem as veias vitelinas, enquanto as células centrais se tornam as células sanguíneas hematopoiéticas primitivas na mesoderme extraembrionária (Cox & Poole, 2000; Eichmann et al., 2002; Gilbert & Barresi, 2016; DeSesso, 2017). À medida que as ilhas sanguíneas crescem, elas se fundem para formar a rede capilar drenando as duas veias vitelinas, que trazem alimentos e células sanguíneas para o coração recém-formado. As células-tronco de segunda geração colonizam outros órgãos e a hematopoiese começa no baço (Gilbert & Barresi, 2016; DeSesso, 2017).

Já no processo da angiogênese, os vasos são formados *de novo* através da diferenciação de células endoteliais, os angioblastos (Patel-Hett & D'Amore, 2011; DeSesso, 2017). Durante esse processo, células endoteliais no vaso sanguíneo respondem ao sinal do VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*) e ocorre a migração dessas células para o mesênquima circundante formando um novo vaso, que se funde com as outras ilhas de sangue formando plexos angioblásticos.

A contaminação com agrotóxicos pode levar a um enfraquecimento dos vasos no momento da sua formação, o que pode ocasionar sua ruptura, gerando hemorragias, que podem resultar em altas taxas de mortalidade (Zhu et al., 2019). Danos nos vasos sanguíneos que ocasionam as hemorragias podem ser resultado de alterações nas junções celulares, viabilidade e migração de células endoteliais (Lu et al., 2016). As hemorragias também podem ser causadas por defeitos endoteliais, ocasionadas por deficiência na atividade da enzima ADAM17 (*ADAM metallopeptidase domain 17*), que cliva substratos envolvidos no desenvolvimento vascular, como Notch, Delta e VEGFR2, e inibe a proliferação celular (Canault et al., 2010).

De maneira semelhante ao observado no presente trabalho como resultado do tratamento com Rovral®, Goyal et al. (2010), ao testar o inseticida tiaclopride, detectaram hemorragia nos embriões de galinha, acometendo órgãos como fígado, coração, rins e pulmão. Hemorragias na cabeça, coxa e rins de embriões de galinha também foram ocasionados pelo

tratamento com o inseticida clorpirifós (Roopadevi et al., 2012). Resultados parecidos já foram reportados em outras espécies, como, por exemplo, em peixes. Hemorragias cerebrais foram observadas no trabalho de Pamanji et al. (2015) ao testar diferentes concentrações do inseticida monocrotofós em embriões de *Danio rerio*. Nessa mesma espécie, Sarty et al. (2017) observaram hemorragias cardíacas nos embriões tratados com o inseticida dieldrina e Zhu et al. (2019) observaram hemorragias cerebrais em embriões tratados com fenobucarb, ocasionado pelo enfraquecimento dos vasos. No presente estudo, as hemorragias foram observadas no sétimo dia de desenvolvimento embrionário, tanto em embriões vivos ($n = 3$) como em embriões mortos ($n = 30$). Com exceção de um embrião com hemorragia que apresentava outras características incompatíveis com a vida, pode-se especular que os demais tenham morrido em razão das hemorragias observadas. Estudos mais aprofundados serão necessários para compreender de que forma o Rovral® afeta o desenvolvimento dos vasos sanguíneos, e o quão danoso para a sua sobrevivência é este efeito.

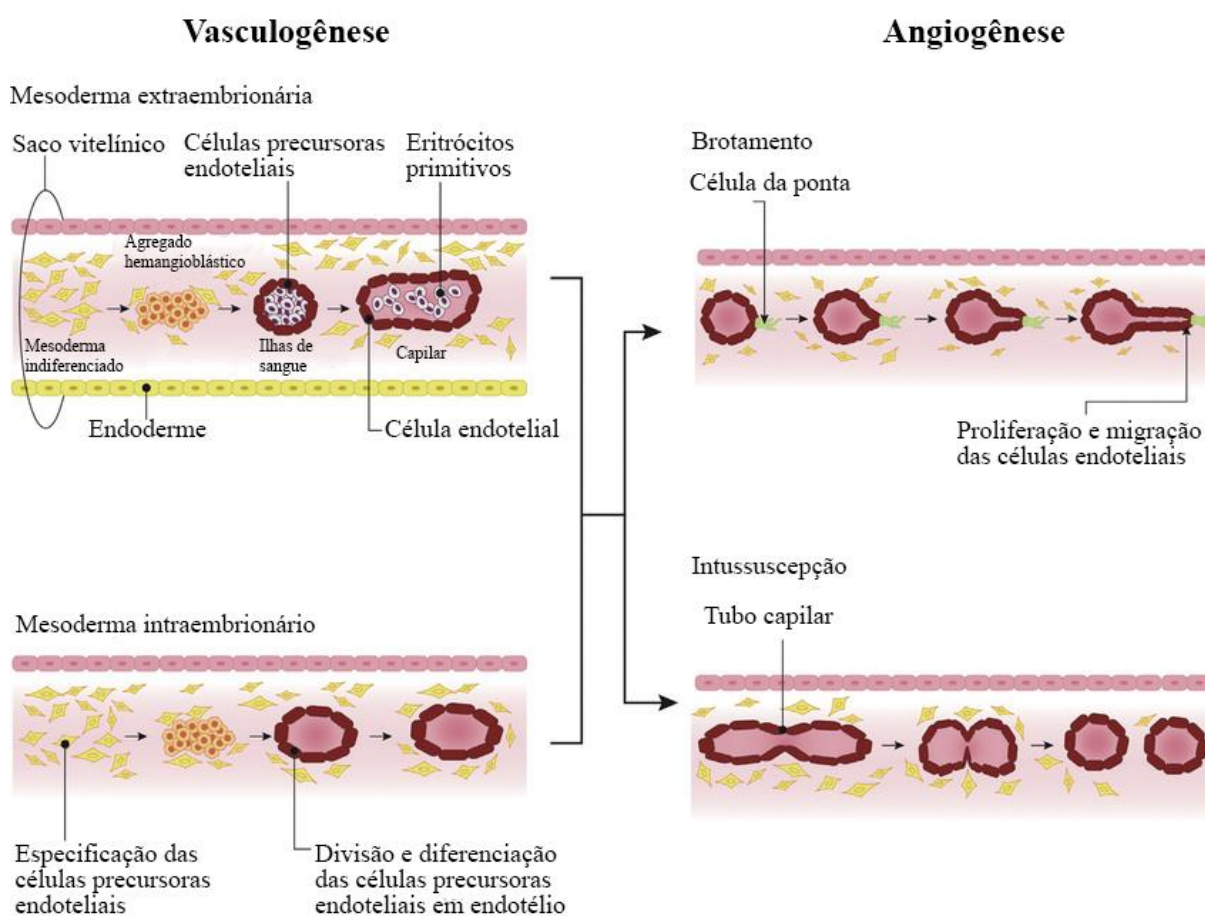


Figura 27 - Vasculogênese (extra e intraembrionária) e angiogênese. **Fonte:** DeSesso, 2017 (modificado).

5.4.1.5 Malformações caudais

No final da gastrulação, o nó de Hensen e a linha primitiva estão restritos à extremidade posterior e se tornaram um aglomerado de células, o botão caudal, que contém uma massa de mesoderme responsável pela formação dos somitos, da notocorda e do tubo neural naquela região (Le Douarin, 2001). Com o dobramento embrionário, o restante da linha primitiva e o nó de Hensen tornam-se deslocados para o lado ventral do cóccix, onde forma-se a crista ectodérmica ventral. A expressão dos genes *Nog* (*Noggin*) adjacentes à crista ectodérmica ventral inibe a sinalização de BMP no botão caudal, que, por sua vez, suprime a crista ectodérmica ventral e regula o comprimento da cauda. A partir do botão da cauda, as estruturas se desenvolvem de forma contínua com as demais estruturas mais anteriores, através de processos distintos. O tubo neural da cauda se forma pela cavitação de mesênquima, levando a neurulação secundária. Quando o botão caudal começa a regredir, o tubo neural e a notocorda atingem a ponta da cauda. Tanto o intestino da cauda quanto os somitos são acometidos posteriormente pela morte celular e desaparecem (Bellairs & Osmond, 2014). De acordo com Le Douarin (2001), a morte celular caudal ocorre devido à ausência de estruturas adjacentes secretando a proteína Shh.

Alguns dos embriões tratados com Rovral® apresentaram regressão da cauda, indicando a interferência deste composto com os processos descritos acima. A regressão da cauda já foi reportada em embriões de galinha tratados com o inseticida lufenuron (Pinakin et al., 2011) e em embriões de peixe-zebra tratados com os inseticidas endosulfan (Moon et al., 2016) e sumition (Shadiqur et al., 2020). Alterações deste tipo causam diminuição da cauda, responsável pelo centro de massa/gravidade, alterando consequentemente a postura e a locomoção das aves (Grossi et al., 2014), causando também alterações no vôo/planagem (Akers & Denbow, 2013), e interferindo no dimorfismo sexual (Yu et al., 2004). Estudos futuros podem indicar exatamente quais processos são afetados pela contaminação com o fungicida testado no presente trabalho, que podem resultar na regressão caudal.

5.4.2 Alterações no estadiamento e peso

Os agrotóxicos podem causar atrasos no desenvolvimento embrionário. Este atraso pode ser percebido através do estadiamento dos embriões no momento da sua coleta. O estadiamento é feito através da comparação das estruturas formadas e seu aspecto morfológico,

ao invés de se basear no tempo de desenvolvimento, para determinar a idade (estágio) embrionária em que aquele indivíduo se encontra. Para embriões de galinha, o estadiamento é feito classicamente com base no trabalho de Hamburger & Hamilton (1951). Após sete dias de incubação, é esperado que o embrião se encontre entre os estágios HH31 e HH33 (Hamburger & Hamilton, 1951), já tendo passado pelo período da organogênese, possuindo um corpo simétrico, membros com cotovelos e joelhos articulados, asas e patas com dígitos e membranas entre eles, olhos bem desenvolvidos, bico desenvolvido com uma estrutura na maxila denominada “dente de ovo”, assim como a presença de botões das penas pelo tronco.

Um atraso na idade/estágio de desenvolvimento após contaminação com compostos químicos pode ser atribuído a uma diminuição no *fitness*, ocasionada pelo gasto extra de energia para metabolizar as toxinas no corpo. Neste trabalho, entretanto, não houve diferença estatística no estadiamento, tanto entre embriões controles e tratados, quanto entre as concentrações. O mesmo foi reportado para embriões do anfíbio *Rana temporaria* tratados com os herbicidas ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), cianazina, o fungicida azoxistrobina, e os inseticidas permetrina, esfenvalerato e pirimicarbe, que não demonstraram diferença na idade de metamorfose (Johansson et al., 2006), e para larvas de ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) expostas ao inseticida clorpirifós, que também não tiveram diferença na velocidade de metamorfose (Aluigi et al., 2010).

Além de provocar atrasos no desenvolvimento, os pesticidas podem afetar outras características dos organismos, como o peso total do corpo. Neste trabalho, entretanto, os pesos dos embriões que sobreviveram ao tratamento com Rovral® em suas diferentes concentrações não apresentaram alterações. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies, como em trabalhos que testaram diferentes doses dos fungicidas azoxistrobina no salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) (Olsvik et al., 2010), mancozebe em adultos machos do pássaro *Amandava amandava* (Pandey & Mohanty, 2017), assim como para o herbicida glifosato no anfíbio *Bufo americanus* (Relyea, 2012). Para embriões dos anfíbios *Pseudacris regilla*, *Rana cascadae* e *Rana aurora*, o tratamento com o inseticida cipermetrina também não afetou o peso corporal (Biga & Blaustein, 2013).

Os parâmetros de idade/estágio e peso embrionário não alterados para embriões de galinha coletados vivos após contaminação com Rovral® indicam que os embriões que conseguiram sobreviver mesmo às concentrações mais altas do fungicida, puderam continuar seu desenvolvimento em uma velocidade normal, apesar do aparecimento de algumas alterações morfológicas/metabólicas/genéticas, conforme relatado no presente trabalho.

5.5 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS

5.5.1 Estudo de alterações nas medidas de estruturas do corpo

A contaminação com compostos químicos pode ocasionar alterações no tamanho de algumas estruturas do corpo. Por exemplo, foi relatada alteração no comprimento do tíbiotarso e do bico de embriões de galinha tratados com o herbicida glifosato e Roundup® (Winnick & Dzialowski, 2013), no diâmetro da cabeça e olhos, no comprimento do bico, pescoço, úmero, rádio, ulna, metacarpo, fêmur, fíbula e metatarso de galinhas tratadas com o inseticida clorantropilol (Abbas et al., 2018), bem como no comprimento corporal e occipitofrontal de galinhas tratadas com o inseticida bifentrina (Khanum et al., 2019).

No presente trabalho foram analisadas as medidas da cabeça, olhos, membros superior e inferior e tronco de embriões de galinha após tratamento com Rovral®. Essas medidas foram escolhidas pois são facilmente acessíveis para mensuração, estão bem consolidadas na literatura e também estão envolvidas com os diversos efeitos dos agrotóxicos na morfometria (Greenberg & Laham, 1969; Rao et al., 1992; Mobarak & Al-Asmari, 2011; Chaudhary et al., 2017). As análises de medidas não foram individualizadas por estadiamento, pois não houve diferença significativa entre os estágios. Foi observado que não houve alterações nas medidas dos embriões tratados em relação aos controles e também entre as concentrações. De forma semelhante, filhotes de ratos com mães tratadas com o inseticida d-trans-aletrina apresentaram medidas de estruturas corporais como tamanho do corpo, cérebro, membros superiores e inferiores e a cauda semelhantes aos embriões controles (Upadhyay et al., 2017). Em *Rana temporaria*, tanto a cauda como o corpo não tiveram diferenças no tamanho quando tratados com os inseticidas esfenvalerato e permetrina, e o herbicida MCPA (Johansson et al., 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de que os embriões que sobreviveram ao tratamento com agrotóxico conseguiram desenvolver as estruturas do corpo de forma satisfatória, no que diz respeito ao seu tamanho.

5.5.2 Estudo de alterações na simetria bilateral de estruturas do corpo

Estudos sobre a assimetria de ambos lados de uma parte do corpo são importantes para monitorar os níveis e efeitos de poluentes sobre organismos (Clarke & McKenzie, 1992). Poluentes, como os agrotóxicos, podem gerar instabilidades no

desenvolvimento que levam à perda da simetria bilateral, um padrão chamado assimetria flutuante. Esse padrão é definido como um desvio aleatório da simetria bilateral perfeita com uma distribuição normal em torno de uma média zero. O aumento na assimetria flutuante de traços bilateralmente simétricos pode ser causado por fatores tanto ambientais como genéticos (Valen, 1962; Palmer & Strobeck, 1986). A simetria desempenha um papel importante durante a vida das espécies. Em pássaros, a assimetria influencia na eficiência de vôo por alterações nas asas e cauda (Hambly et al. 2004), na seleção sexual (Brown et al., 2008) e é um fator correlacionado com o comportamento de canibalismo e na escolha de vítimas. Em galinhas, os indivíduos canibalistas (normalmente maiores e mais altos) escolhem suas vítimas segundo a aparência física “diferente” (Yngvesson & Keeling, 2001).

Neste trabalho a utilização do agrotóxico não causou assimetrias entre os embriões tratados em relação aos controles. No entanto, quando analisada a assimetria entre os tratamentos, foi observada uma diferença significativa entre as concentrações de 300 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$ para membros superiores, onde a concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$ apresentou uma média maior de assimetria para estas estruturas. De modo semelhante, larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* tratadas com o inseticida/larvicida temefos apresentaram diferenças na assimetria das asas perante diferentes concentrações (Mpho et al., 2001). Também as larvas da Odonata *Ceriagrion* sp. tratadas com diferentes concentrações do inseticida/nematicida triazofós apresentaram assimetrias diferentes quanto ao comprimento da tíbia (Chang et al., 2007). No entanto, como no presente trabalho não houve diferença significativa em relação aos embriões controle, pode-se inferir que os animais conseguiriam se desenvolver de forma normal.

5.6 ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS

5.6.1 Glicemia

O índice glicêmico é um indicador bioquímico sensível ao estresse (Beyea et al, 2005), sendo utilizado para inferir possíveis alterações fisiológicas causadas por toxicidade. Os níveis de glicose no sangue podem ser afetados pelos agrotóxicos, conforme já relatado em alguns estudos, como um aumento de glicose em ratos tratados com o inseticida malation (Lasram et al., 2008) e monocrotofós (Velmurugan et al., 2017). Alterações na glicemia podem afetar o desenvolvimento dos membros do embrião pois a glicose é um metabólito essencial

para a síntese de glicosaminoglicanos pelos condrócitos, tendo papel fundamental para a viabilidade e matriz de condrócitos (Mobasher et al. 2002). A hiperglicemia causa efeitos deletérios na formação da cartilagem, como a produção de espécies reativas do oxigênio e diminuição da síntese de proteoglicanos (Rosa et al., 2009), causada pela diminuição dos níveis de heparan sulfato produzidos por células endoteliais (Gharagozlian et al., 2006). Apesar disto, neste trabalho não houve diferença nos níveis de glicose encontrados nos embriões de galinha. De maneira semelhante, embriões de galinha tratados com o inseticida cipermetrina (Anwar, 2003) e embriões do peixe *Rhamdia quelen* tratados com o herbicida glifosato (Kreutz et al., 2011) não demonstraram alterações na glicemia. Entretanto, os testes de glicemia foram realizados apenas com a concentração de 300 µL/mL, e diferenças mais expressivas (apesar de não estatisticamente significativas) na formação dos membros superiores foram observadas quando a concentração de 500 µL/mL foi analisada. Assim, é necessário verificar se testes de glicemia com concentrações mais elevadas resultariam em alterações significativas, que poderiam estar relacionadas à formação inadequada dos membros superiores. Além disso, o número amostral reduzido de embriões analisados ($n = 28$) na execução desta etapa do trabalho pode ter prejudicado a análise dos resultados. Estes e outros parâmetros bioquímicos e metabólicos devem ser melhor analisados futuramente para verificar se o Rovral® oferece riscos a outros processos fisiológicos dos organismos, que podem levar a anomalias do desenvolvimento.

5.6.2 Anormalidades nucleares dos eritrócitos

A presença de micronúcleos representa danos no material genético e o aparecimento de anormalidades nucleares também representa genotoxicidade. Os agrotóxicos possuem genotoxicidade que pode levar a diversos efeitos, como aparecimento de câncer e anormalidades morfológicas (Bolognesi, 2003). Tanto os micronúcleos como as alterações nucleares vêm sendo utilizados como indicadores de exposição a substâncias genotóxicas (Ngan et al., 2007).

Os eritrócitos das aves, diferentemente dos mamíferos, permanecem nucleados ao longo da vida, mas, como os mamíferos, passam por uma sequência de alterações em sua hemoglobina durante a embriogênese (Bellairs & Osmond, 2014). Os agrotóxicos podem ocasionar lesões no DNA ou na estrutura nuclear, e os eritrócitos das aves representam um excelente modelo para verificação destas anormalidades. No presente trabalho, a análise de

alterações nucleares nos eritrócitos de embriões de galinha tratados com Rovral® revelou que não houve frequências significativas de micronúcleos e da maioria das anormalidades nucleares dos embriões tratados em relação aos controles, excetuando a anormalidade de eritrócito binucleado. Resultados parecidos foram encontrados para linfócitos humanos tratados *in vitro* com concentrações do inseticida imidacloprida e do fungicida metalaxil, nos quais não foi observado aumento da frequência de micronúcleos (Demsia et al., 2007). No trabalho de González et al. (2017), as concentrações testadas do herbicida Roundup® em embriões do réptil *Caiman latirostris* não resultaram em frequências significativas para micronúcleos, assim como o tratamento com o herbicida quinclorac em embriões de galinha (Conceição & Protti, 2012). Tanto a frequência de micronúcleos como as anormalidades nucleares (*notched*, *bud*, excêntrico, irregular e anucleado) não foram estatisticamente significantes em embriões do réptil *Salvator merianae* tratados com Roundup® (Schaumburg et al., 2016), assim como concentrações do inseticida clorpirifós testados em juvenis do peixe *Cyprinus carpio* (Mitkovska & Chassovnikarova, 2019).

O tratamento com Rovral® em concentração próxima à sua LC₂₅ (300 µL/mL) resultou em aumento significativo de eritrócitos binucleados. Resultados semelhantes já foram reportados em outros trabalhos, como em hepatócitos de ratos tratados com o acaricida bromopropilato e o inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) (Kostka et al., 1996), eritrócitos periféricos de *Anguilla anguilla* tratados com o inseticida Decis® (deltametrina) (Marques et al., 2014) e células bucais de trabalhadores agrícolas expostos a agrotóxicos (Adad et al., 2015). As células binucleadas aparecem em eventos de aneuploidia, causada pela segregação incorreta de cromossomos (Shi & King, 2005). Nas condições amostrais dos experimentos realizados, esses resultados indicam que o Rovral® não possui forte efeito genotóxico, pois houve pouca indução de alterações nucleares em eritrócitos de embriões de aves, quando em concentração de 300 µL/mL. Entretanto, outros estudos, como o ensaio do cometa, podem ser úteis para a conclusão definitiva da segurança deste fungicida. Além disso, o reduzido número amostral utilizado para essas análises (n = 28) pode ter prejudicado os resultados, sendo necessário estudos mais aprofundados no futuro.

6 CONCLUSÕES

Os tratamentos com o Rovral® demonstraram ser significativamente mais letais que os respectivos controles. A partir dos dados de mortalidade, a LC_{50} calculada através da equação da reta resultou em um valor de 738 $\mu\text{L/mL}$, o que representa 492 vezes a concentração recomendada para uso.

Os tratamentos com Rovral® não causaram taxas estatisticamente maiores de malformação que os seus respectivos controles em embriões vivos. Entretanto, ressalta-se que diversas malformações foram observadas tanto em embriões vivos como em embriões mortos, dentre as quais, as mais frequentes foram as alterações cefálicas/craniais, oculares, hemorrágicas e no tronco. Os defeitos na região cefálica foram principalmente de ausência do bico, formação incompleta da própria cabeça e microftalmia. As hemorragias ocorreram tanto nas laterais do corpo, como em órgãos e cabeça. Para o tronco, foram observados principalmente órgãos internos aparentemente protuberantes e coração ectópico.

O peso total dos embriões vivos e o seu estadiamento, assim como as medidas das estruturas da cabeça, olhos, membros superior e inferior e tronco, e sua simetria bilateral não apresentaram diferença significativa entre os embriões tratados e os controles e entre as concentrações, indicando que os embriões que conseguiram sobreviver até o sétimo dia de desenvolvimento após tratamento com Rovral® seguiram um padrão normal no que diz respeito à velocidade e crescimento, apesar do aparecimento das malformações relatadas.

Por fim, nas análises sanguíneas realizadas com o tratamento de 300 $\mu\text{L/mL}$ (aproximadamente equivalente à LC_{25}), os dados de glicemia e presença de micronúcleos não diferiram entre embriões tratados e controles. Dentre as anormalidades nos eritrócitos, apenas a anormalidade binucleada diferiu entre embriões tratados e controles, apesar do número amostral reduzido, o que pode ter prejudicado os resultados.

Dessa forma, os resultados indicam que o Rovral® apresenta baixa letalidade para embriões de galinha, e possivelmente para demais amniotos, quando aplicado de maneira aguda. Apesar da elevada LC_{50} , diversos tipos de malformação foram observados, em especial hemorragias, representando riscos para a sobrevivência dos organismos. Ademais, é importante ressaltar que contaminações crônicas podem representar riscos ainda maiores à saúde e integridade física dos animais e seres humanos, e serão foco de estudos futuros.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; IQBAL, R.; BUTT, M. Z.; NIAZ, S.; HALEEM, S.; ULLAH, S.; UMER, M.; IRFAN, A.; ALSAID, M. S.; ULLAH, R. Teratogenic effects of chlorantraniliprole on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Indian Journal of Animal Research**, v. 52, n. 5, p. 669-673, 2018.
- ABBAS, S.; IQBAL, R.; HALEEM, S.; NIAZ, S.; ULLAH, R.; SHAHAT, A. A.; FAHD, A. N.; BARI, A. Teratological effect of indoxacarb on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Indian Journal of Animal Research**, DOI: 10.18805/ijar.B-1179, Article Id: B-1179, 2019.
- ABZHANOV, A.; KUO, W. P.; HARTMANN, C.; GRANT, B. R.; GRANT, P. R.; TABIN, C. J. The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 563-567, 2006.
- ACQUARONI, M.; SVARTZ, G.; PÉREZ, C. C. Developmental toxicity assessment of a chlorothalonil-based fungicide in a native amphibian species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2020.
- ADAD, L. M. D. M.; ANDRADE, H. H. R. D.; KVITKO, K.; LEHMANN, M.; CAVALCANTE, A. A. D. C. M.; DIHL, R. R. Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 308-315, 2015.
- ADAPAR. **Agrotóxicos no Paraná**. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná, out. 2020. Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/index.asp>>. Acessado em: 28 out. 2020.
- ADEDARA, I. A.; VAITHINATHAN, S.; JUBENDRADASS, R.; MATHUR, P. P.; FAROMBI, E. O. Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 444-453, 2013.
- ADLER, R.; BELECKY-ADAMS, T. L. The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. **Development**, v. 129, n. 13, p. 3161-3171, 2002.
- AIRE, T. A. Short-term effects of carbendazim on the gross and microscopic features of the testes of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Anatomy and Embryology**, v. 210, n. 1, p. 43-49, 2005.
- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. Anatomy and physiology of domestic animals. 2 ed. Wiley-Blackwell, 684 p., 2013.
- AKSAKAL, F. I.; CILTAS, A. Developmental toxicity of penconazole in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 200, p. 8-15, 2018.
- ALHIFI, M. A. Effect of pesticides mixture of dimethoate and methidathion on acetylcholinesterase during embryo development using chick embryo model. **Egyptian**

Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2018.

ALONSO, P. D.; MILNER, A. C.; KETCHAM, R. A.; COOKSON, M. J.; ROWE, T. B. The avian nature of the brain and inner ear of Archaeopteryx. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 666-669, 2004.

ALUIGI, M. G.; ANGELINI, C.; FALUGI, C.; FOSSA, R.; GENEVER, P.; GALLUS, L.; LAYER, PG. G.; PRESTIPINO, G.; RAKONCZAY, Z.; SGRO, M.; THIELECKE, H.; TROMBINO, S. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 157, p. 305-316, 2005.

ALUIGI, M. G.; FALUGI, C.; MUGNO, M. G.; PRIVITERA, D.; CHIANTORE, M. Dose-dependent effects of chlorpyrifos, an organophosphate pesticide, on metamorphosis of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 3, p. 520-529, 2010.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2674-2682, 2013.

AMEL, C.; KHELILI, K.; BOULAKOUD, M. S. Effect of vacomil on some reproductive and biochemical profiles of male pigeons. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 40, n. 2, p. 4-7, 2016.

ANDLEEB, S.; ASMATULLAH, E. S.; QAZI, J. I. In-ovo evaluation of bioremediated malathion. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2014.

ANDLEEB, S.; ZAHID, F.; NOOR-UL-AIN, Y. N.; ARA, C. Vulnerability of three days old chick embryos to permethrin induced toxicities. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 33, n. 1, p. 47-53, 2018.

ANGELOVA, L. **Wild birds as a bioindicator for wildlife toxicity in pineapple cultivation areas in Northern Costa Rica**. 2016. 143 f. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine) - University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Alemanha, 2016.

Anvisa. **Painel de monografias de agrotóxicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2020. Disponível em: <<http://portalanalitico.anvisa.gov.br/monografias-de-agrotoxicos>>. Acessado em: 29 set. 2020.

ANWAR, K. Cypermethrin, a pyrethroid insecticide induces teratological and biochemical changes in young chick embryos. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 1698-1705, 2003.

ANWAR, T.; AHMAD, I.; TAHIR, S. Determination of pesticide residues in soil of Nawabshah District, Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, n. 1, 2012.

ARANHA, A.; ROCHA, L. **“Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios – consulte o seu**. Agência Pública, 15 abr. 2019. Disponível em: <<https://apublica.org/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios-consulte-o-seu/>>. Acessado em: 28 out. 2020.

ARCAIN, B. M. S. **Efeito do iprodiona (Rovral®) no desenvolvimento de *Gallus gallus***. 2017. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) - Universidade Federal da Integração Latino-americana, Foz do Iguaçu, Paraná, 2017.

ARONZON, C. M.; SANDOVAL, M. T.; HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S. Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 373-381, 2011.

ASMATULLAH, E. S.; ANDLEEB, S.; QAZI, J. I. Embryotoxicity of methylparathion in developing chick. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 17, p. 28-34, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUÍMICA FINA, BIOTECNOLOGIA E SUAS ESPECIFICIDADES
- ABIFINA. **Defensivos Agrícolas**. 2020. Disponível em:
<<http://www.abifina.org.br/segmentos.php?sc=3&ssc=4>>. Acessado em: 9 fev. 2020.

BADYAEV, A. V. How do precise adaptive features arise in development? Examples with evolution of context-specific sex ratios and perfect beaks. **The Auk**, v. 128, n. 3, p. 467-474, 2011.

BAI, H.; ZHU, J.; SUN, Y.; LIU, R.; LIU, N.; LI, D.; WEN, J.; CHEN, J. Identification of genes related to beak deformity of chickens using digital gene expression profiling. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. e107050, 2014.

BEKETOV, M. A.; KEFFORD, B. J.; SCHAFER, R. B.; LIESS, M. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11039-11043, 2013.

BELDEN, J.; MCMURRY, S.; SMITH, L.; REILLEY, P. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2477-2480, 2010.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. 3 ed. Oxford: Academic Press, Elsevier, 692 p., 2014.

BERNABÒ, I.; GUARDIA, A.; MACIRELLA, R.; SESTI, S.; CRESCENTE, A.; BRUNELLI, E. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 56-66, 2016.

BERNABÒ, I.; GUARDIA, A.; MACIRELLA, R.; SESTI, S.; TRIPEPI, S.; BRUNELLI, E. Tissues injury and pathological changes in *Hyla intermedia* juveniles after chronic larval exposure to tebuconazole. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111367, 2020.

BEYEA, M. M.; BENFEY, T. J.; KIEFFER, J. D. Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 303, 2005.

BHASKAR, N.; SHAHANI, L.; BHATNAGAR, P. Toxicological implications of a commercial formulation of deltamethrin (Decis®) in developing chick embryo. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 2, p. 369-378, 2016.

BIGA, L. M.; BLAUSTEIN, A. R. Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2855-2860, 2013.

BLANKENSHIP, A. L.; HILSCHEROVA, K.; NIE, M.; COADY, K. K.; VILLALOBOS, S. A.; KANNAN, K.; POWELL, D. C.; BURSIA, S. J.; GIESY, J. P. Mechanisms of TCDD-induced abnormalities and embryo lethality in white leghorn chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 47-62, 2003.

BLUM, J. L.; NYAGODE, B. A.; JAMES, M. O.; DENSLOW, N. D. Effects of the pesticide methoxychlor on gene expression in the liver and testes of the male largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic toxicology**, v. 86, n. 4, p. 459-469, 2008.

BLYSTONE, C. R.; LAMBRIGHT, C. S.; FURR, J.; WILSON, V. S.; GRAY, L. E. Iprodione delays male rat pubertal development, reduces serum testosterone levels, and decreases ex vivo testicular testosterone production. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1, p. 74-81, 2007.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 1860-1869, 2013.

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M.; ROTHERMEL, B. B. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. **Oecologia**, v. 129, n. 4, p. 518-524, 2001.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1989. Seção 1, p. 11459. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acessado em: 11 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada: protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 2006. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agrotoxicos.pdf>. Acessado em: 11 jan. 2018.

BRONNER, M. E. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 138, n. 2, p. 179-186, 2012.

BROWN, W. M.; PRICE, M. E.; KANG, J.; POUND, N.; ZHAO, Y.; YU, H. Fluctuating asymmetry and preferences for sex-typical bodily characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12938-12943, 2008.

BRUNS, G. A. P; INGRAM, V. M. The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo. **Philosophical Transactions of the Royal Society London, B: Biological Sciences**, v. 266, n. 877, p. 225-305, 1973.

BUDD, R.; ENSMINGER, M.; WANG, D.; GOH, K. S. Monitoring fipronil and degradates in California surface waters, 2008 – 2013. **Journal of Environmental Quality**, v. 44, n. 4, p. 1233-1240, 2015.

CANAULT, M.; CERTEL, K.; SCHATZBERG, D.; WAGNER, D. D.; HYNES, R. O. The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation. **PloS One**, v. 5, n. 10, 2010.

CAO, F.; SOUDERS, C. L.; LI, P.; PANG, S.; QIU, L.; MARTYNIUK, C. J. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 5, p. 4913-4923, 2019a.

CAO, F.; SOUDERS II; C. L., LI, P.; ADAMOVSKY, O.; PANG, S.; QIU, L.; MARTYNIUK, C. J. Developmental toxicity of the fungicide ziram in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 214, 303-313, 2019b.

CARNEIRO, L. S.; MARTÍNEZ, L. C.; GONÇALVES, W. G.; SANTANA, L. M.; SERRÃO, J. E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 109991, 2020.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CASTAÑO, A.; SANCHEZ, P.; LLORENTE, M. T.; CARBALLO, M.; DE LA TORRE, A.; MUÑOZ, M. J. The use of alternative systems for the ecotoxicological screening of complex mixtures on fish populations. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 337-348, 2000.

CCOHS. What is a LD₅₀ and LC₅₀?. **Canadian Centre for Occupational Health and Safety**, 2018. Disponível em: < <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>>. Acessado em: 16 fev. 2020.

CHANG, X.; ZHAI, B.; WANG, M.; WANG, B. Relationship between exposure to an insecticide and fluctuating asymmetry in a damselfly (Odonata, Coenagriidae). **Hydrobiologia**, v. 586, n. 1, p. 213-220, 2007.

CHAUDHARY, S.; ANSARI, M. S.; ABBAS, M. N.; KAUSAR, S.; IQBAL, R.; SALEEM, R.; SABIR, J. I. S. Toxic effects of chlorpyrifos on 12th day desi chick embryo (*Gallus gallus domesticus*). **Nucleus**, v. 54, n. 2, p. 136-140, 2017.

CHAUFAN, G.; GALVANO, C.; NIEVES, M.; MUDRY, M. D.; RÍOS DE MOLINA, M. D. C.; ANDRIOLI, N. B. Oxidative response and micronucleus centromere assay in HEp-2 cells exposed to fungicide iprodione. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 745-752, 2019.

CHOWDHURY, R.; CHATTORAJ, S.; BANDYOPADHYAY, A.; DEY, S. R. Teratogenic and embryotoxic effects of synthetic pyrethroids on chick (*Gallus Domesticus*) embryo. **Indian Journal of Biology**, v. 2, n. 1, p. 61, 2014.

CHRISTIN, M. S.; MÉNARD, L.; GIROUX, I.; MARCOGLIESE, D. J.; RUBY, S.; CYR, D.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P. Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 601-611, 2013.

CHU, S. H.; LIAO, P. H.; CHEN, P. J. Developmental exposures to an azole fungicide triadimenol at environmentally relevant concentrations cause reproductive dysfunction in females of medaka fish. **Chemosphere**, v. 152, p. 181-189, 2016.

CLARKE, G. M; MCKENZIE, L. J. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 6, p. 2045–2050, 1992.

CLAVERT, J. Symmetrization of the egg of vertebrates. **Advances in Morphogenesis**, v. 2, p. 27-60, 1962.

CONCEIÇÃO, M.; PROTTI, B. Genotoxicity of selected pesticides in the hen's egg test for micronucleus induction. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, 2012.

COX, C. M.; POOLE, T. J. Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. **Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 218, n. 2, p. 371-382, 2000.

CREUZET, S.; COULY, G.; LE DOUARIN, N. M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 5, p. 447-459, 2005.

CURL, C. L.; FENSKE, R. A.; KISSEL, J. C.; SHIRAI, J. H.; MOATE, T. F.; GRIFFITH, W.; CORONADO, G.; THOMPSON, B. Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 12, p. A787-A792, 2002.

- CUSAAC, J. P. W.; MORRISON, S. A.; BELDEN, J. B.; SMITH, L. M.; MCMURRY, S. T. Acute toxicity of Headline® fungicide to blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 447-455, 2016.
- D'SOUZA, J.; INDRAJIT, I. K.; MENON, S. Limb body wall complex. **Medical Journal, Armed Forces India**, v. 60, n. 1, p. 77, 2004.
- DALY, G. L.; LEI, Y. D.; TEIXEIRA, C.; MUIR, D. C.; CASTILLO, L. E.; JANTUNEN, L. M.; WANIA, F. Organochlorine pesticides in the soils and atmosphere of Costa Rica. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 4, p. 1124-1130, 2007.
- DAUNDKAR, P. S.; RAMPAL, S. Evaluation of ameliorative potential of selenium on carbendazim induced oxidative stress in male goats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 711-719, 2014.
- DE LA PAZ, J. F.; BEIZA, N.; PAREDES-ZÚÑIGA, S.; HOARE, M. S.; ALLENDE, M. L. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 710, 2017.
- DE VEAUX, R. D.; VELLEMAN, P. F.; BOCK, D. E. **Intro stats**. 5 ed. Boston: Pearson, 800 p., 2018.
- DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 634, n. 1-2, p. 32-39, 2007.
- DESESSO, J. M. Vascular ontogeny within selected thoracoabdominal organs and the limbs. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 3-20, 2017.
- DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of vehicle volume. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 260-269, 2005.
- DI MARZIO, W. D.; SÁENZ, M. E.; ALBERDI, J. L.; FORTUNATO, N.; CAPPELLO, V.; MONTIVERO, C.; AMBRINI, G. Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1907-1917, 2010.
- DUNACHIE, J. F.; FLETCHER, W. W. An investigation of the toxicity of insecticides to birds' eggs using the egg-injection technique. **Annals of Applied Biology**, v. 64, n. 3, p. 409-423, 1969.
- DUTRA, L. S.; FERREIRA, A. P. Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. **Saúde em Debate**, v. 41, p. 241-253, 2017.
- EICHMANN, A.; PARDANAUD, L.; YUAN, L.; MOYON, D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 207-214, 2002.

EL-SHERSHABY, A. E. F. M.; LASHEIN, F. E. D. M.; SELEEM, A. A.; AHMED, A. A. Developmental neurotoxicity after penconazole exposure at embryo pre-and post-implantation in mice. **Journal of Histotechnology**, p. 1-12, 2020.

EPA. **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6 ed. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 277 p., 2013.

ETCHEGOYEN, M. A.; RONCO, A. E.; ALMADA, P.; ABELANDO, M.; MARINO, D. J. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 2, p. 63, 2017.

EUROPEAN COMMISSION – HEALTH & CONSUMER PROTECTION
DIRECTORATE-GENERAL. **Review report for the active substance iprodione**. 3 de dez. de 2002. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=69>>. Acessado em: 11 jan. 2018.

EVANS, A. N.; LLANOS, J. E.; KUNIN, W. E.; EVISON, S. E. Indirect effects of agricultural pesticide use on parasite prevalence in wild pollinators. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 258, p. 40-48, 2018.

FALANDYSZ, J.; BRUDNOWSKA, B.; KAWANO, M.; WAKIMOTO, T. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soils from the southern part of Poland. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, n. 2, p. 173-178, 2001.

FAN, F. M.; MESQUITA, M. O.; SANTOS, V. C. F. D.; LUCAS, E. O.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; BANDEIRA, N. M. G. Resíduos de agrotóxicos em água e solo de município em região produtora de fumo no Rio Grande do Sul. **Saúde Coletiva, Desenvolvimento e (In) Sustentabilidades no Rural**. p. 89-108, 2018.

FAO. International code of conduct on the distribution and use of pesticides: guidance on pest and pesticide management policy development. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 35 p., 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/card/en/c/2d9b8851-716a-55a8-b6d5-3527a41d39ff>>. Acessado em: 09 fev. 2020.

FAO. International code of conduct on the distribution and use of pesticides (revised version). **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 36 p., 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/y4544e/y4544e00.htm>>. Acessado em: 09 fev. 2020.

FAO. Specifications and evaluations for agricultural pesticides. Iprodione. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 30 p., 2006.

FAO. The future of food and agriculture – Trends and challenges. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 163 p., 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6881e.pdf>>. Acessado em: 15 fev 2020.

FAOSTAT. Pesticide indicators: Pesticides - Average use per area of cropland. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 2019b. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>>. Acessado em: 15 fev. 2020.

FAOSTAT. Pesticide use: Pesticide (Total). **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**, 2019a. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>>. Acessado em: 04 mar. 2020.

FARAG, A.; EBRAHIM, H.; ELMAZOU DY, R.; KADOUS, E. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 122-130, 2011.

FASENKO, G. M. Egg storage and the embryo. **Poultry science**, v. 86, n. 5, p. 1020-1024, 2007.

FAURE, S.; DE SANTA BARBARA, P.; ROBERTS, D. J.; WHITMAN, M. Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. **Developmental Biology**, v. 244, n. 1, p. 44-65, 2002.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, C. L. F.; VOLCÃO, L. M.; RAMIRES, P. F.; DE MOURA, R. R.; JÚNIOR, F. M. R. D. S. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.

FISHER, A.; COLEMAN, C.; HOFFMANN, C.; FRITZ, B.; RANGEL, J. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 3, p. 802-808, 2017.

FMC AGRÍCOLA. **Rovral SC – Relatório do produto**. N° 00878600, 2019. Disponível em: <<https://www.fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Rovral.pdf>>. Acessado em: 25 mar. 2019.

FMC AGRÍCOLA. **Rovral SC – Relatório do produto**. N° 02208591, 2020. Disponível em: <<https://www.fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Rovral%20SC.pdf>>. Acessado em: 25 fev. 2020.

FREITA, V. S.; LOPES, M. A.; MEIRELES, J. R. C.; REIS, L.; CERQUEIRA, E. D. M. M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 189, 2014.

GERESLASSIE, T.; WORKINEH, A.; ATIENO, O. J.; WANG, J. Determination of occurrences, distribution, health impacts of organochlorine pesticides in soils of central China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, p. 146, 2019.

GHARAGOZLIAN, S.; BORREBÆK, J.; HENRIKSEN, T.; OMSLAND, T. K.; SHEGARFI, H.; KOLSET, S. O. Effect of hyperglycemic condition on proteoglycan

secretion in cultured human endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 7, p. 369-375, 2006.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Developmental biology**. 11 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 810 p., 2016.

GOBELI, A.; CROSSLEY II, D.; JOHNSON, J.; REYNA, K. The effects of neonicotinoid exposure on embryonic development and organ mass in northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 195, p. 9-15, 2017.

GONZÁLEZ, E. L.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91, 2017.

GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S.; AIZPÚN, J. E.; ISLA, F. I.; & PEÑA, A. Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). **Chemosphere**, v. 81, n. 3, p. 351-358, 2010.

GONZÁLEZ-ALCARAZ, M. N.; MALHEIRO, C.; CARDOSO, D. N.; PRODANA, M.; MORGADO, R. G.; VAN GESTEL, C. A.; LOUREIRO, S. Bioaccumulation and toxicity of organic chemicals in terrestrial invertebrates. In: **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 149-189, 2020.

GOYAL, S.; SANDHU, H. S.; BRAR, R. S. Histopathological alterations induced after oral sub-acute thiacloprid toxicity in *Gallus domesticus*. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 5, p. 673-682, 2010.

GREENBERG, J.; LAHAM, Q. N. Malathion-induced teratisms in the developing chick. **Canadian Journal of Zoology**, v. 47, n. 4, p. 539-542, 1969.

GROSSI, B.; IRIARTE-DÍAZ, J.; LARACH, O.; CANALS, M.; VÁSQUEZ, R. A. Walking like dinosaurs: chickens with artificial tails provide clues about non-avian theropod locomotion. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e88458, 2014.

GROTE, K.; NIEMANN, L.; SELZSAM, B.; HAIDER, W.; GERICKE, C.; HERZLER, M.; CHAHOUD, I. Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 27, n. 11, p. 2368-2374, 2008.

GRUE, C. E.; SHIPLEY, B. K. Sensitivity of nestling and adult starlings to dicotophos, an organophosphate pesticide. **Environmental Research**, v. 35, n. 2, p. 454-465, 1984.

GÜRKAN, M.; HAYRETDAG, S. Acute toxicity of maneb in the tadpoles of common and green toad/Akutna toksičnost maneba u punoglavaca smeđe i zelene krastače. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 3, p. 189-195, 2015.

GUSTAFSSON, K.; BLIDBERG, E.; ELFGREN, I. K.; HELLSTRÖM, A.; KYLIN, H.; GOROKHOVA, E. Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 431-444, 2010.

HALLDIN, K.; HOLM, L.; RIDDERSTRÅLE, Y.; BRUNSTRÖM, B. Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after *in ovo* exposure to o,p'-DDT. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 2, p. 116-122, 2003.

HALLMANN, C. A.; FOPPEN, R. P.; VAN TURNHOUT, C. A.; DE KROON, H.; JONGEJANS, E. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 341, 2014.

HAMBLY, C.; HARPER, E. J.; SPEAKMAN, J. R. The energetic cost of variations in wing span and wing asymmetry in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 22, p. 3977-3984, 2004.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HASHIMI, M. H.; HASHIMI, R.; RYAN, Q. Toxic effects of pesticides on humans, plants, animals, pollinators and beneficial organisms. **Asian Plant Research Journal**, p. 37-47, 2020.

HASHIZUME, R.; NODA, A.; ITOH, M.; YAMAMOTO, Y.; MASUI, S.; OKA, M.; NAKAMURA, T. Studies on teratological testing using chicken embryos. **Experimental Animals**, v. 41, n. 3, p. 349-356, 1992.

HAYASAKA, D.; KORENAGA, T.; SUZUKI, K.; SAITO, F.; SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 355-362, 2012.

HENEBERG, P.; BOGUSCH, P.; ASTAPENKOVÁ, A. The effects of contact exposure to azole fungicides on insect metamorphosis. **Crop Protection**, v. 121, p. 66-72, 2019.

HENSHEL, D. S.; HEHN, B.; WAGEY, R.; VO, M.; STEEVES, J. D. The relative sensitivity of chicken embryos to yolk-or air-cell-injected 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Environmental Toxicology and Chemistry: an International Journal**, v. 16, n. 4, p. 725-732, 1997.

HOOSER, E. A.; BELDEN, J. B.; SMITH, L. M.; MCMURRY, S. T. Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1458-1464, 2012.

HUAN, Z.; LUO, J.; XU, Z.; XIE, D. Acute toxicity and genotoxicity of carbendazim, main impurities and metabolite to earthworms (*Eisenia foetida*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 62-69, 2016.

HUSSEIN, M.; SINGH, V.; HASSAN, M.; SINGH, A.; YADAV, B. Malformations and teratogenic effects of imidacloprid on chick embryo. **Scholars Journal of Applied Medical Sciences**, v. 2, p. 67-72, 2014.

IBRAHIM, L.; PREUSS, T. G.; RATTE, H. T.; HOMMEN, U. A list of fish species that are potentially exposed to pesticides in edge-of-field water bodies in the European Union—a first step towards identifying vulnerable representatives for risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2679-2687, 2013.

IRIE, N.; KURATANI, S. The developmental hourglass model: a predictor of the basic body plan?. **Development**, v. 141, n. 24, p. 4649-4655, 2014.

JAACKS, L. M.; DIAO, N.; CALAFAT, A. M.; OSPINA, M.; MAZUMDAR, M.; HASAN, M. O. S. I.; WRIGHT, R.; QUAMRUZZAMAN, Q.; CHRISTIANI, D. C. Association of prenatal pesticide exposures with adverse pregnancy outcomes and stunting in rural Bangladesh. **Environment International**, v. 133, p. 105243, 2019.

JOHANSSON, M.; PIHA, H.; KYLIN, H.; MERILÄ, J. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 12, p. 3164-3170, 2006.

KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; TAKAHASHI, S.; SHIMIZU, A.; SHIRAISHI, H. Reevaluation of the developmental toxicity of dieldrin by the use of fertilized Japanese quail eggs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 84-90, 2010.

KANE, A. S.; SALIERNO, J. D.; BREWER, S. K. Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. **Methods in Aquatic Toxicology**, v. 2, p. 559-590, 2005.

KHALIL, A. M.; EL-DAWAY, E.S.F.A. Genotoxicity and embryotoxicity of the insecticide primicid in chick embryo. **Qatar University Science Journal**, v. 20, p. 125-130, 2000.

KHANUM, Z.; SULEMAN, S.; MUSTANSER, A.; HASSAN, M. W. U.; RAEES, K.; KANWAL, M. A.; ZIA, A.; AHMADA, K. R. Comparative teratological outcomes of fluoride ions and a fluoridated insecticide (bifenthrin) in chick embryos. **Fluoride**, v. 52, n. 1, p. 59-65, 2019.

KIM, J. H.; SMITH, A. Distribution of organochlorine pesticides in soils from South Korea. **Chemosphere**, v. 43, n. 2, p. 137-140, 2001.

KMECICK, M.; VIEIRA DA COSTA, M. C.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.

KONG, A.; ZHANG, C.; CAO, Y.; CAO, Q.; LIU, F.; YANG, Y.; TONG, Z.; REHMAN, M. U.; WANG, X.; HUANG, S. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111400, 2020.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing chicken eggs for developmental studies. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 8, p. e306, 2007.

KOSTKA, G.; KOPEĆ-SZŁĘZAK, J.; PALUT, D. Early hepatic changes induced in rats by two hepatocarcinogenic organohalogen pesticides: bromopropylate and DDT. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 407-412, 1996.

KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; DE FARIA VALLE, S.; SILVA, T. O., ANZILIERO, D.; DOS SANTOS, E. D.; PIVATO, M.; ZANATTA, R. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 51-57, 2011.

KRIEF, S.; BERNY, P.; GUMISIRIZA, F.; GROSS, R.; DEMENEIX, B.; FINI, J. B.; CHAPMAN, C. A.; CHAPMAN, L. J.; SEGUYA, A.; WASSWA, J. Agricultural expansion as risk to endangered wildlife: Pesticide exposure in wild chimpanzees and baboons displaying facial dysplasia. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 647-656, 2017.

LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. **Integrated pest management and pest control: current and future tactics**. Rijeka, Croatia: InTech, 668 p., 2012.

LASRAM, M. M.; ANNABI, A. B.; REZG, R.; ELJ, N.; SLIMEN, S.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. Effect of short-time malathion administration on glucose homeostasis in Wistar rat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 3, p. 114-119, 2008.

LE DOUARIN, N. M. Early neurogenesis in Amniote vertebrates. **International Journal of Developmental Biology**, v. 45, n. 1, p. 373-378, 2001.

LEHRAIKI, A.; MESSIAEN, S.; BERGES, R.; CANIVENC-LAVIER, M. C.; AUGER, J.; HABERT, R.; LEVACHER, C. Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on rat fetal germ cell development. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 424-430, 2011.

LENKOWSKI, J. R.; SANCHEZ-BRAVO, G.; MCLAUGHLIN, K. A. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1305-1308, 2010.

LI, D.; LIU, M.; YANG, Y.; SHI, H.; ZHOU, J.; HE, D. Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 868-874, 2016.

LIU, N.; JIN, X.; ZHOU, J.; WANG, Y.; YANG, Q.; WU, F.; GIESY, J. P.; JOHNSON, A. C. Predicted no-effect concentration (PNEC) and assessment of risk for the fungicide, triadimefon based on reproductive fitness of aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 207, p. 682-689, 2018.

LOPEZ-ANTIA, A.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; BLAS, E. G. D.; CAMARERO, P. R.; MOUGEOT, F.; MATEO, R. Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 1320-1329, 2015.

LOPEZ-ANTIA, A.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MOUGEOT, F.; CAMARERO, P. R.; MATEO, R. Brood size is reduced by half in birds feeding on flutriafol-treated seeds below the recommended application rate. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 418-426, 2018.

LOPEZ-ANTIA, A.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MOUGEOT, F.; MATEO, R. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 1, p. 125-138, 2013.

LU, W. H.; SHI, Y. X.; MA, Z. L.; WANG, G.; LIU, L.; CHUAI, M.; SONG, X.; MÜNSTERBERG, A.; CAO, L.; YANG, X. Proper autophagy is indispensable for angiogenesis during chick embryo development. **Cell Cycle**, v. 15, n. 13, p. 1742-1754, 2016.

LUDWIKOWSKA, A.; BOJARSKI, B.; SOCHA, M.; LUTNICKA, H.; TRZECIAK, K. B. The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching. **Fisheries & Aquatic Life**, v. 21, n. 4, p. 367-371, 2013.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO FILHO, A. D. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAHBOOB, S.; NIAZI, F.; ALGHANIM, K.; SULTANA, S.; AL-MISNED, F.; AHMED, Z. Health risks associated with pesticide residues in water, sediments and the muscle tissues of *Catla catla* at Head Balloki on the River Ravi. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 3, p. 81, 2015.

MALLARINO, R.; GRANT, P. R.; GRANT, B. R.; HERREL, A.; KUO, W. P.; ABZHANOV, A. Two developmental modules establish 3D beak-shape variation in Darwin's finches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4057-4062, 2011.

MARQUES, A.; CUSTÓDIO, M.; GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. Assessment of chromosomal damage induced by a deltamethrin-based insecticide in fish (*Anguilla anguilla* L.)—a follow-up study upon exposure and post-exposure periods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 40-46, 2014.

MARQUES, A.; REGO, A.; GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 52-58, 2016.

MARTIN, G. R. The subtlety of simple eyes: the tuning of visual fields to perceptual challenges in birds. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1636, p. 20130040, 2014.

MASKEY, E.; CROTTY, H.; WOOTEN, T.; KHAN, I. A. Disruption of oocyte maturation by selected environmental chemicals in zebrafish. **Toxicology In Vitro**, v. 54, p. 123-129, 2019.

MATEO, R.; PETKOV, N.; LOPEZ-ANTIA, A.; RODRÍGUEZ-ESTIVAL, J.; GREEN, A. J. Risk assessment of lead poisoning and pesticide exposure in the declining population of red-breasted goose (*Branta ruficollis*) wintering in Eastern Europe. **Environmental Research**, v. 151, p. 359-367, 2016.

MATHUR, P.; TAPARIA, N.; NITU, K.; SHAHANI, L. Insecticide Marshal® EC induces teratological changes in the embryos of *Gallus domesticus*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 267-274, 2013.

MATSUMOTO, K. I.; HOSOKAWA, M.; KURODA, K.; ENDO, G. I. N. J. I. Toxicity of agricultural chemicals in *Daphnia magna*. **Osaka City Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 89-97, 2009.

MATSUSHITA, S.; YAMASHITA, J.; IWASAWA, T.; TOMITA, T.; IKEDA, M. Effects of *in ovo* exposure to imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1641-1647, 2006.

MAYNE, G. J.; MARTIN, P. A.; BISHOP, C. A.; BOERMANS, H. J. Stress and immune responses of nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*) and eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to nonpersistent pesticides and p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene in apple orchards of southern Ontario, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry: an International Journal**, v. 23, n. 12, p. 2930-2940, 2004.

MCLAUGHLIN, J.; MARLIAC, J. P.; VERRET, J.; MUTCHLER, M. K.; FITZHUGH, O. C. The injection of chemicals into the yolk sac of fertile eggs prior to incubation as a toxicity test. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 760-771, 1963.

MERCIER, S.; DAVID, V.; RATIÉ, L.; GICQUEL, I.; ODENT, S.; DUPÉ, V. NODAL and SHH dose-dependent double inhibition promotes an HPE-like phenotype in chick embryos. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 2, p. 537-543, 2013.

MIGLIORANZA, K. S. B.; AIZPÚN DE MORENO, J. E.; MORENO, V. J. Dynamics of organochlorine pesticides in soils from a southeastern region of Argentina. **Environmental Toxicology and Chemistry: an International Journal**, v. 22, n. 4, p. 712-717, 2003.

MILLOT, F.; DECORS, A.; MASTAIN, O.; QUINTAINE, T.; BERNY, P.; VEY, D.; LASSEUR, R.; BRO, E. Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds: a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5469-5485, 2017.

MINOUX, M.; RIJLI, F. M. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. **Development**, v. 137, n. 16, p. 2605-2621, 2010.

MISHRA, A.; DEVI, Y. Histopathological alterations in the brain (optic tectum) of the fresh water teleost *Channa punctatus* in response to acute and subchronic exposure to the pesticide Chlorpyrifos. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 176-181, 2014.

MISHRA, K.; SHARMA, R. C.; KUMAR, S. Contamination levels and spatial distribution of organochlorine pesticides in soils from India. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 76, p. 215-225, 2012.

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2019.

MOBARAK, Y. M.; AL-ASMARI, M. A. Endosulfan impacts on the developing chick embryos: Morphological, morphometric and skeletal changes. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, n. 2, p. 107-127, 2011.

MOBASHERI, A.; VANNUCCI, S. J.; BONDY, C. A.; CARTER, S. D.; INNES, J. F.; ARTEAGA, M. F.; TRUJILLO, E.; FERRAZ, I.; SHAKIBAEI, M.; MARTÍN-VASALLO, P. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. **Histology and Histopathology**, v. 17, p. 1239-1267, 2002.

MOHAMMADALIKHANI, M.; LAMEEIHASSANKIADEH, S.; NAJJAR LASHGARI, S.; ABBASIAN, F. Acute toxicity of captan on blood factors total immunoglobulin, liver, and gill tissues of fingerling grass carps: *Ctenopharyngodon idella*. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 7, n. 1, 2017.

MOON, Y. S.; JEON, H. J.; NAM, T. H.; CHOI, S. D.; PARK, B. J.; OK, Y. S.; LEE, S. E. Acute toxicity and gene responses induced by endosulfan in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 28, n. 1-4, p. 103-109, 2016.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. (V.); TORCHIA, M. G. **The developing human: clinically oriented embryology**. 10 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 560 p., 2016.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J. de.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. de O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

MOSLEH, Y. Y.; PARIS-PALACIOS, S.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. Acute and sublethal effects of two insecticides on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) under laboratory conditions. **Environmental Toxicology: an International Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2003.

MPHO, M.; HOLLOWAY, G. J.; CALLAGHAN, A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. **Chemosphere**, v. 45, n. 6-7, p. 713-720, 2001.

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 5, p. 1151-1154, 2004.

MYLLYNEN, P.; VÄHÄKANGAS, K. Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 1, p. 507-512, 2013.

NEGOITA, T. G.; COVACI, A.; GHEORGHE, A.; SCHEPENS, P. Distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides in soils from the East Antarctic coast. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 5, n. 2, p. 281-286, 2003.

NGAN, P. V.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; USSAMI, K. A.; CAMPOS, D. Y. F.; ROCHA, A. J. S.; PEREIRA, B.A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”, King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p. 209-217, 2007.

NHGRI/NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **Researchers compare chicken, human genomes: analysis of first avian genome uncovers differences between birds and mammals**. ScienceDaily, 08 de dez. de 2004. Disponível em: <<https://www.genome.gov/12514316/2004-release-researchers-compare-chicken-human-genomes/2004-release-researcherscompare-chicken-human-genomes/>>. Acessado em: 11 jan. 2018.

NIKOLOPOULOU, E.; GALEA, G. L.; ROLO, A.; GREENE, N. D.; COPP, A. J. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. **Development**, v. 144, n. 4, p. 552-566, 2017.

NITU, K.; SHAHANI, L.; TAPARIA, N.; BHATNAGAR, P. Teratogenic and biochemical effects of a formulation containing dicofol in the chick embryo. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 7, p. 1411-1421, 2012.

OECD. **Guidance document on acute inhalation toxicity testing. Series on testing and assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28/REV1**. 2 ed. Paris: OECD, 2018.

OLSVIK, P. A.; KROGLUND, F.; FINSTAD, B.; KRISTENSEN, T. Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1852-1861, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Control technology for the formulation and packing of pesticides. Geneva: **Organização Mundial da Saúde**, 79 p., 1992.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OPAS/OMS). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: **Organização Panamericana da Saúde/Organização Mundial da Saúde**, 69 p., 1996.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586-1595, 2010.

PAL, A. K.; PRASAD, R. L.; PRASAD, A.; SINGH, S. K.; KUMAR, A.; JADHAO, S. B. PAL, A. K. et al. In ovo embryotoxicity of α -endosulfan adversely influences liver and brain

metabolism and the immune system in chickens. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 82, n. 2, p. 103-114, 2005.

PALANIKUMAR, L.; KUMARAGURU, A. K.; RAMAKRITINAN, C. M.; ANAND, M. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 765-774, 2014.

PALMER, A. R.; STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, n. 1, p. 391-421, 1986.

PAMANJI, R.; BETHU, M. S.; YASHWANTH, B.; LEELAVATHI, S.; RAO, J. V. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7744-7753, 2015.

PANDEY, S. P.; MOHANTY, B. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on co-exposures to dithiocarbamate and neonicotinoid pesticides: Study in a wildlife bird, *Amandava amandava*. **Neurotoxicology**, v. 60, p. 16-22, 2017.

PANDEY, S. P.; MOHANTY, B. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife bird. **Chemosphere**, v. 122, p. 227-234, 2015.

PARKER, M. L.; GOLDSTEIN, M. I. Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European Starling (*Sturnus vulgaris*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 233-242, 2000.

PATEL, L.; BHATT, R. Effect of commercially available insecticide on antioxidant enzymes during chick embryonic development. **Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 2, p. 171-181, 2013.

PATEL-HETT, S.; D'AMORE, P. A. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 55, p. 353, 2011.

PERKINS, P. J.; BOERMANS, H. J.; STEPHENSON, G. R. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 19, n. 4, p. 940-945, 2000.

PETROVOVÁ, E.; MAŽENSKÝ, D.; VDOVIAKOVÁ, K.; MASSANYI, P.; LUPTÁKOVÁ, L.; SMRČO, P. Effect of bendiocarb on development of the chick embryo. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 5, p. 397-401, 2010.

PETROVOVA, E.; VDOVIAKOVÁ, K.; DANKO, J.; KRESAKOVA, L.; MALOVESKA, M. Body weight and malformations in relation to pesticide embryotoxicity. **International Journal of Applied Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 811-816, 2016.

PINAKIN, W.; DESHPANDE, S. G.; SALOKHE, S. G. Studies on the effect of the insect growth regulator lufenuron on embryogenesis of chick *Gallus domesticus* (white leghorn strain). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, p. 82-88, 2011.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 684 p., 2008.

POURMIRZA, A. A. Toxic effects of malathion and endosulfan on chick embryo. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, p. 161-166, 2000.

PRASHANTKUMAR, W.; SETHI, R. S.; PATHAK, D.; RAMPAL, S.; SAINI, S. P. S. Testicular damage after chronic exposure to carbendazim in male goats. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 7, p. 1433-1442, 2012.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Neuroscience**. 2 ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001

QOMARIYAH, S.; SETIANI, O.; SUHARTONO, S. History of pesticide exposure as a risk factor for spontaneous abortion in female farmers in Bandungan District, Semarang Regency. **International Journal of English Literature and Social Sciences (IJELS)**, v. 4, n. 4, 2019.

QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE, C. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. **PLoS One**, v. 4, n. 11, 2009.

QUINTANEIRO, C.; SOARES, A. M. V. M.; MONTEIRO, M. S. Effects of the herbicides linuron and S-metolachlor on Perez's frog embryos. **Chemosphere**, v. 194, p. 595-601, 2018.

RACHID, R.; HOURIA, D.; MOHAMMED-RÉDA, D. Impact of Flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development *in ovo*. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 2, n. 3, p. 87-91, 2008.

RADICE, S.; FERRARIS, M.; MARABINI, L.; GRANDE, S.; CHIESARA, E. Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 1-2, p. 51-58, 2001.

RAO, J. V.; SWAMY, A. N.; YAMIN, S.; RAO, S. H.; RAHMAN, M. F. Teratism induced in the developing chick by RPR-V, an organophosphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, n. 11, p. 945-951, 1992.

RAPPAZZO, K. M.; WARREN, J. L.; MEYER, R. E.; HERRING, A. H.; SANDERS, A. P.; BROWNSTEIN, N. C.; LUBEN, T. J. Maternal residential exposure to agricultural pesticides and birth defects in a 2003 to 2005 North Carolina birth cohort. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 106, n. 4, p. 240-249, 2016.

RELYEA, R. A. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. **Ecological Applications**, v. 22, n. 2, p. 634-647, 2012.

RELYEA, R. A. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 351-357, 2005.

RICO, A.; SABATER, C.; CASTILLO, M. A. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 222-229, 2016.

RICO, A.; VAN DEN BRINK, P. J. Evaluating aquatic invertebrate vulnerability to insecticides based on intrinsic sensitivity, biological traits, and toxic mode of action. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1907-1917, 2015.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; XIMENES, V. F.; DE ANDRADE, R. M. B.; TALAMONI, J. L. B.; LIBÂNIO, M.; DE ALMEIDA, M. V.; APON, B. M.; CAVALARI, A. A. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 1949-1958, 2006.

ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; PLAKORNKUL, V.; SRIPAORAYA, K.; JORAKIT, W.; ROONGRUANGCHAI, K. The teratogenic effects of dichlorvos on the development of chick embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 1, p. 44-52, 2018a.

ROONGRUANGCHAI, J.; VIRAVUD, Y.; PLAKORNKUL, V.; SRIPAORAYA, K.; VIJITSOMBAT, N.; ROONGRUANGCHAI, K. The teratogenic effects of glyphosate based herbicide (gbh) on the development of chick embryos. **Siriraj Medical Journal**, v. 70, n. 5, p. 419-428, 2018b.

ROOPADEV, Y. S.; NARAYANASWAMY, H. D.; CHANDRASHEKHARA, N.; SATHYANARAYANA, M. L. Studies on pathology of chlorpyrifos toxicity in chick embryos. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 12, n. 3, p. 3307, 2012.

ROSA, S. C.; GONÇALVES, J.; JUDAS, F.; MOBASHERI, A.; LOPES, C.; MENDES, A. F. Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. R80, 2009.

ROSS. **Identify infertile eggs and early deads**. In: Aviagen. How to... Hatchery. 19 de julho de 2017. Disponível em: <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Resources_Tools/Hatchery_How_Tos/AviagenHatcheryHowToSummary-1to11-EN17.pdf>. Acessado em: 05 jan. 2020.

ROSSONI, C. C. **Toxicologia dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon* sp.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus)**. 2019. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Licenciatura) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, 2019.

RUNDLÖF, M.; ANDERSSON, G. K. S.; BOMMARCO, R.; FRIES, I.; HEDERSTRÖM, V.; HERBERTSSON, L.; JONSSON, O.; KLATT, B. K.; PEDERSEN, T. R.; YOURTONE, J.; SMITH, H. G. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 77-80, 2015.

SABIR, S.; ANSARI, M. S.; ABBAS, M. N.; IQBAL, R.; IQBAL, J.; KAUSAR, S.; CHAUDHARY, S. Teratological effects of Dimethoate on 12th day desi chick embryo (*Gallus gallus domesticus*). **Biological Sciences-PJSIR**, v. 58, n. 3, p. 159-164, 2015.

SADLER, T. W. The embryologic origin of ventral body wall defects. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 19, n. 3, p. 209-214, 2010.

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

SAGANUWAN, S. A. Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: an overview. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 20, n. 4, 2017.

SAKR, S. A.; SHALABY, S. Y. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 3, p. 259-267, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 545 p., 1989.

SARAVANAN, M.; KIM, J. Y.; KIM, H. N.; KIM, S. B.; KO, D. H.; HUR, J. H. Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 491-499, 2015.

SARDAR, K.; ZAFAR, K.; KHALID, U.; SATTAR, N.; MUSTABSHIRA, Z.; PERVEEN, S. Effect of abamectin on development of chick embryo. **Pure and Applied Biology**. v. 9, n. 2, p. 1266-1278, 2020.

SARTY, K. I.; COWIE, A.; MARTYNIUK, C J. The legacy pesticide dieldrin acts as a teratogen and alters the expression of dopamine transporter and dopamine receptor 2a in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 194, p. 37-47, 2017.

SCHAUMBURG, L. G.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L.; MUDRY, M. D. Genotoxicity induced by Roundup®(Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 71-78, 2016.

SCHNEIDER, R. A.; HU, D.; RUBENSTEIN, J. L.; MADEN, M.; HELMS, J. A. Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. **Development**, v. 128, n. 14, p. 2755-2767, 2001.

SCHOENWOLF, G. C. Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1-2-3, p. 49-55, 2018.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: A model for descriptive and experimental embryology. In: **Cell Lineage and Fate Determination**. Academic Press, p. 429-436, 1999.

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 38-45, 2001.

SECHMAN, A.; HRABIA, A.; LIS, M. W.; NIEDZIÓŁKA, J. Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on steroid concentrations in blood and gonads of chicken embryo. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 190-195, 2011.

SHADIQUR, R. M.; ISLAM, S. M.; ANAMUL, H.; MD, S. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 317-323, 2020.

SHAFI, M.; KAMIL, S. A.; MIR, M. S.; DARZI, M. M.; BHAT, A. S.; SHAH, S.; DAR, K. H. Haematological Study on the Fungicide Ziram Induced Acute, Subacute and Subchronic Toxicity in Broiler Chickens. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 15, n. 2, p. 635, 2016.

SHARMA, S. **Pesticide induced developmental malformations a mechanistic study in chick embryo**. 2019. Thesis (Ph.D.) - Department of Zoology, Faculty of Science, The Maharaja Sayajirao University of Baroda, Vadodara.

SHENOY, K.; CUNNINGHAM, B. T.; ENFROE, J. W.; CROWLEY, P. H. Growth and survival of northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles exposed to two common pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry: an International Journal**, v. 28, n. 7, p. 1469-1474, 2009.

SHI, Q.; KING, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1038-1042, 2005.

SIGMA-ALDRICH. **1x PBS (Phosphate-Buffered Saline) Recipe Calculator**. Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. 2020. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/western-blotting/buffers-recipes/1x-phosphate-buffered-saline.html>>.

SILVA, A. R. R.; CARDOSO, D. N.; CRUZ, A.; LOURENÇO, J.; MENDO, S.; SOARES, A. M.; LOUREIRO, S. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 279-290, 2015.

SILVA, V.; MOL, H. G.; ZOMER, P.; TIENSTRA, M.; RITSEMA, C. J.; GEISSEN, V. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532-1545, 2019.

SINDIVEG. **O que você precisa saber sobre defensivos agrícolas**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, ago. 2020. Disponível em: <<https://sindiveg.org.br/wp->

content/uploads/2020/08/SINDIVEG_Paper_REV_FINAL_2020_bxresolucao.pdf>.
Acessado em: 28 out. 2020.

SINGH, V.; HUSSEIN, M.; SINGH, A. K.; HASSAN, M. A.; GUPTA, P. Histological and immunohistochemical changes in cerebellum of chick embryos after exposure to neonicotinoid insecticide imidacloprid. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 64, n. 2, p. 122-127, 2015.

SKEFFINGTON, K. L.; BECK, C.; ITANI, N.; GIUSSANI, D. A. Isolating the direct effects of adverse developmental conditions on *in vivo* cardiovascular function at adulthood: the avian model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 4, p. 460-466, 2018.

SLIMANI, S.; HAMOUDA, S.; SOUADI, C.; SILINI, S.; ABDENNOUR, C.; DELIMI, L. The Fungicide Thiram may Disrupt Reproductive Cycle of Domestic Male Pigeon (*Columba livia domestica*) Subjected to a Long Photoperiod. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 50, n. 5, p. 1693-1701, 2018.

SONI, I.; SYED, F.; BHATNAGAR, P.; MATHUR, R. Perinatal toxicity of cyfluthrin in mice: developmental and behavioral effects. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 1096-1105, 2011.

SOUDERS II, C. L.; XAVIER, P.; PEREZ-RODRIGUEZ, V.; ECTOR, N.; ZHANG, J. L.; MARTYNIUK, C. J. Sub-lethal effects of the triazole fungicide propiconazole on zebrafish (*Danio rerio*) development, oxidative respiration, and larval locomotor activity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 74, p. 106809, 2019.

STANIC, K.; SALDIVIA, N.; FÖRSTERA, B.; TORREJÓN, M.; MONTECINOS, H.; CAPRILE, T. Expression patterns of extracellular matrix proteins during posterior commissure development. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 10, p. 89, 2016.

SVARTZ, G.; MEIJIDE, F.; COLL, C. P. Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 1-7, 2016a.

SVARTZ, G. V.; ARONZON, C. M.; COLL, C. S. P. Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2906-2913, 2016b.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology**. 14 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 1232 p., 2014.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 101, n. 712, p. 483-514, 1927.

TU, C.; WANG, Y.; DUAN, W.; HERTL, P.; TRADWAY, L.; BRANDENBURG, R.; LEE, D.; SNELL, M.; HU, S. Effects of fungicides and insecticides on feeding behavior and community dynamics of earthworms: Implications for casting control in turfgrass systems. **Applied Soil Ecology**, v. 47, n. 1, p. 31-36, 2011.

TYRRELL, L. P.; MOORE, B. A.; LOFTIS, C.; FERNÁNDEZ-JURICIC, E. Looking above the prairie: localized and upward acute vision in a representative grassland bird. **Scientific Reports**, v. 3; n. 3231, 2013.

UCHIYAMA, M.; KONNO, N. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 54-61, 2006.

UEKER, M. E.; SILVA, V. M.; MOI, G. P.; PIGNATI, W. A.; MATTOS, I. E.; SILVA, A. M. C. Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study. **BMC Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 125, 2016.

UGGINI, G. K.; PATEL, P. V.; BALAKRISHNAN, S. Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: a comparative study using two commercial formulations. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 166-174, 2012.

UPADHYAY, J.; RANA, M.; JUYAL, V.; RANA, A.; BISHT, S. S. Effect of pesticide exposure on the female rats and their pups throughout their Gestation Period. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 10, n. 8, p. 2535-2537, 2017.

VALEN, L. V. A study of fluctuating asymmetry. **Evolution**, v. 16, n. 2, p. 125-142, 1962.

VAN BOXTEL, A. L.; PIETERSE, B.; CENIJN, P.; KAMSTRA, J. H.; BROUWER, A.; VAN WIERINGEN, W.; DE BOER; LEGLER, J. Dithiocarbamates induce craniofacial abnormalities and downregulate sox9a during zebrafish development. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 1, p. 209-217, 2010.

VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. **PloS One**, v. 8, n. 5, 2013.

VAN METER, R. J.; GLINSKI, D. A.; HONG, T.; CYTERSKI, M.; HENDERSON, W. M.; PURUCKER, S. T. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. **Environmental Pollution**, v. 193, p. 262-268, 2014.

VAN OOSTEN, H. H.; VAN DEN BURG, A. B.; ARLT, D.; BOTH, C.; VAN DEN BRINK, N. W.; CHIU, S.; CRUMP, D.; JEPPSSON, T.; DE KROON, H.; TRAAG, W.; SIEPEL, H. Hatching failure and accumulation of organic pollutants through the terrestrial food web of a declining songbird in Western Europe. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 1547-1553, 2019.

VÁRNAGY, L.; BUDAI, P.; MOLNÁR, E.; FÜZESI, I.; FÁNCISI, T. Teratogenicity testing of BI 58 EC (38% dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 49, n. 3, p. 355-361, 2001.

VELMURUGAN, G.; RAMPRASATH, T.; SWAMINATHAN, K.; MITHIEUX, G.; RAJENDHRAN, J.; DHIVAKAR, M.; PARTHASARATHY, A.; BABU, D. D. V.; THUMBURAJ, L. J.; FREDDY, A. J.; DINAKARAN, V.; PUHARI, S. S. M.; REKHA, B.; CHRISTY, Y. J.; ANUSHA, S.; DIVYA, G.; SUGANYA, K.; MEGANATHAN, B.; KALYANARAMAN, N.; VASUDEVAN, V.; KAMARAJ, R.; KARTHIK, M.; JEYAKUMAR, B.; ABHISHEK, A.; PAUL, E.; PUSHPANATHAN, M.; RAJMOHAN, R.

K.; VELAYUTHAM, K.; LYON, A. R.; RAMASAMY, S. Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 8, 2017.

VERDENELLI, R. A.; LAMARQUE, A. L.; MERILES, J. M. Short-term effects of combined iprodione and vermicompost applications on soil microbial community structure. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 210-219, 2012.

VITOUSEK, P. M.; MOONEY, H. A.; LUBCHENCO, J.; MELILLO, J. M. Human domination of Earth's ecosystems. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 494-499, 1997.

WADE, A.; LIN, C. H.; KURKUL, C.; REGAN, E. R.; JOHNSON, R. M. Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 20, 2019.

WANG, Y.; WU, S.; CHEN, J.; ZHANG, C.; XU, Z.; LI, G.; CAI, L.; SHEN, W.; WANG, Q. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**, v. 192, p. 14-23, 2018.

WILLIAMS, T. Animal models of ventral body wall closure defects: a personal perspective on gastroschisis. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 148, n. 3, p. 186-191, 2008.

WILSON, E. R.; SMALLING, K. L.; REILLY, T. J.; GRAY, E.; BOND, L.; STEELE, L.; KANDEL, P.; CHAMBERLIN, A.; GAUSE, J.; REYNOLDS, N.; ROBERTSON, I.; NOVAK, S.; FERIS, K.; WHITE, M. M. Assessing the potential effects of fungicides on nontarget gut fungi (Trichomycetes) and their associated larval black fly hosts. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 420-433, 2014.

WINNICK, B.; DZIALOWSKI, E. M. The effects of glyphosate based herbicides on chick embryo morphology during development. **The Federal of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 27, p. 874-912, 2013

WU, S.; LEI, L.; LIU, M.; SONG, Y.; LU, S.; LI, D.; SHI, H.; RALEY-SUSMAN, K. M.; HE, D. Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to *Xenopus tropicalis* embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 8-15, 2018.

YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, 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.

YAMAMURO, M.; KOMURO, T.; KAMIYA, H.; KATO, T.; HASEGAWA, H.; KAMEDA, Y. Neonicotinoids disrupt aquatic food webs and decrease fishery yields. **Science**, v. 366, n. 6465, p. 620-623, 2019.

YASHWANTH, B.; PAMANJI, R.; RAO, J. V. Toxicomorphomics and toxicokinetics of quinalphos on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) and its binding affinity towards hatching enzyme, ZHE1. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 155-163, 2016.

YNGVESSON, J.; KEELING, L. J. Body size and fluctuating asymmetry in relation to cannibalistic behaviour in laying hens. **Animal Behaviour**, v. 61, n. 3, p. 609-615, 2001.

YU, M.; YUE, Z.; WU, P.; WU, D. Y.; MAYER, J. A.; MEDINA, M.; WIDELITZ, R. B.; JIANG, T. X.; CHUONG, C. M. The developmental biology of feather follicles. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p. 181, 2004.

YU, S.; WAGES, M. R.; COBB, G. P.; MAUL, J. D. Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. **Environmental Pollution**, v. 181, p. 329-334, 2013.

ZHANG, M.; WANG, W.; ZHANG, Y.; TENG, Y.; XU, Z. Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. **Science of the Total Environment**, v. 599, p. 254-263, 2017.

ZHANG, X. M.; YANG, X. J. Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 233, n. 2, p. 271-290, 2001.

ZHANG, Y.; QI, S.; XING, X.; YANG, D.; DEVI, N. L.; QU, C.; LIU, H. X.; ZHANG, J. Q.; ZENG, F. M. Legacies of organochlorine pesticides (OCPs) in soil of China—a review, and cases in Southwest and Southeast China. In: **Environmental Geochemistry**. Elsevier, p. 543-565, 2018.

ZHU, X. Y.; XIA, B.; WU, Y. Y.; YANG, H.; LI, C. Q.; LI, P. Fenobucarb induces heart failure and cerebral hemorrhage in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 34-41, 2019.

ZUBER, M. E.; GESTRI, G.; VICZIAN, A. S.; BARSACCHI, G.; HARRIS, W. A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. **Development**, v. 130, n. 21, p. 5155-5167, 2003.

ZUBROD, J. P.; BAUDY, P.; SCHULZ, R.; BUNDSCHUH, M. Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 133-143, 2014.

APÊNDICE A - TABELAS

Incubação __/__/__

Coleta __/__/__ ____ µl/mL Repetição ____

	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH	Malformação	Cefálica	Tronco	Membros	Caudal	Olhos	Hemorragia
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
...															
n															
Total															

g – grama; HH – Hamburger e Hamilton

Tabela 2 – Concentrações e grupos experimentais utilizados nos primeiros ensaios para análise de embriotoxicologia de Rovral®.

N amostral de ovos nas concentrações (µL/mL) e grupos experimentais													
Réplica	40		60		80		100		120		140		Total de ovos
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	
1	14	14	20	20	20	20	18	19	20	20	20	20	
2					21	21	23	23	22	22	20	20	
3					23	23	20	20	20	20	21	22	
4					20	20	20	20	20	21			
5					20	21							
6					20	21							
Total	14	14	20	20	124	126	81	82	82	83	61	62	481

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado.

Tabela 3 – Sem tratamento, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Sem tratamento					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
1 _{R1}	59,87	X			0,8377
2 _{R1}	58,31	X			1,0328
3 _{R1}	60,49	X			0,9237
4 _{R1}	55,80	X			0,9674
5 _{R1}	51,15	X			0,9657
6 _{R1}	46,78	X			0,8758
7 _{R1}	50,70	X			1,0805
8 _{R1}	53,42	X			0,9688
9 _{R1}	61,15	X			1,0409
10 _{R1}	57,83	X			0,9715
11 _{R1}	57,14	X			1,0079
12 _{R1}	62,47	X			0,9137
13 _{R1}	51,93	X			0,7929
14 _{R1}	46,51	X			1,1314
15 _{R1}	60,15	X			0,8654
16 _{R1}	57,83	X			0,9063
17 _{R1}	50,55	X			0,8030
18 _{R1}	52,77	X			1,0934

g – grama; R – réplica.

Tabela 3 – Sem tratamento, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Sem tratamento					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
19 _{R1}	51,27	X			1,0332
20 _{R1}	54,04	X			1,0596
1 _{R2}	49,44	X			1,2392
2 _{R2}	41,81			X	
3 _{R2}	49,44	X			1,1121
4 _{R2}	55,28	X			1,2957
5 _{R2}	53,84	X			1,1808
6 _{R2}	57,33	X			0,4202
7 _{R2}	50,02	X			1,2094
8 _{R2}	53,20	X			1,1730
9 _{R2}	48,28			X	
10 _{R2}	67,53			X	
11 _{R2}	51,19	X			0,9757
12 _{R2}	59,84	X			0,8658
13 _{R2}	58,19	X			1,1126
14 _{R2}	50,79	X			1,0634
15 _{R2}	59,97	X			1,1663
16 _{R2}	50,92	X			0,9921
17 _{R2}	52,92			X	
18 _{R2}	58,66			X	
19 _{R2}	48,46	X			0,7455
20 _{R2}	49,99	X			1,0268
21 _{R2}	54,72	X			1,1185
22 _{R2}	47,88		X		
23 _{R2}	50,93	X			1,0292
24 _{R2}	50,85	X			0,9780
25 _{R2}	39,85	X			1,0447
26 _{R2}	50,85	X			1,1413
27 _{R2}	49,19	X			1,1345
28 _{R2}	47,40	X			1,0809
29 _{R2}	41,61	X			0,9335
30 _{R2}	52,39	X			1,0790

g – grama; R – réplica.

Tabela 3 – Sem tratamento, réplicas 1, 2 e 3.
(conclusão)

Sem tratamento					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
31 _{R2}	50,35	X			1,1609
32 _{R2}	55,79	X			1,1375
1 _{R3}	58,04	X			1,0786
2 _{R3}	54,29	X			1,1249
3 _{R3}	54,74	X			1,1099
4 _{R3}	44,98	X			0,9755
5 _{R3}	51,63	X			0,9755
6 _{R3}	54,48	X			1,1850
7 _{R3}	55,98	X			0,8690
8 _{R3}	53,07	X			1,1665
9 _{R3}	56,29	X			0,9746
10 _{R3}	54,93	X			1,1355
11 _{R3}	59,88	X			1,2810
12 _{R3}	64,94		X		
13 _{R3}	54,67	X			0,8340
14 _{R3}	53,80	X			0,8401
15 _{R3}	61,39	X			0,8498
16 _{R3}	46,22	X			1,0518
17 _{R3}	50,72	X			0,9983
18 _{R3}	56,74	X			0,8372
19 _{R3}	60,75	X			0,9593
20 _{R3}	53,84	X			1,0363
21 _{R3}	57,35	X			1,0203
22 _{R3}	52,97	X			0,8595

g – grama; R – réplica.

Tabela 4 – Controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continua)

Controle					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
1 _{R1}	57,93	X			1,0981
2 _{R1}	58,39	X			1,1716
3 _{R1}	61,39	X			0,3888

g – grama; R – réplica.

Tabela 4 – Controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Controle					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
4 _{R1}	54,36	X			0,6746
5 _{R1}	45,37	X			0,8665
6 _{R1}	60,16	X			0,7349
7 _{R1}	57,03	X			0,9688
8 _{R1}	57,87	X			0,3167
9 _{R1}	54,11	X			1,0163
10 _{R1}	55,50	X			1,0012
11 _{R1}	44,83	X			0,4698
12 _{R1}	53,27			X	
13 _{R1}	54,92	X			1,0352
14 _{R1}	61,16		X		
15 _{R1}	46,71	X			0,8605
16 _{R1}	52,53	X			0,8068
17 _{R1}	55,95	X			0,8350
18 _{R1}	57,48	X			0,8790
19 _{R1}	53,84	X			0,8009
20 _{R1}	59,83	X			0,9460
1 _{R2}	59,38		X		
2 _{R2}	48,82	X			1,1161
3 _{R2}	42,73	X			1,2135
4 _{R2}	49,73	X			1,0039
5 _{R2}	57,67	X			1,2332
6 _{R2}	47,66	X			1,2807
7 _{R2}	56,88	X			1,2236
8 _{R2}	46,80	X			1,1923
9 _{R2}	49,43	X			1,0359
10 _{R2}	45,60	X			1,1037
11 _{R2}	41,91	X			1,0777
12 _{R2}	50,08	X			1,0957
13 _{R2}	50,18	X			1,0968
14 _{R2}	41,55		X		0,1004
15 _{R2}	48,14	X			0,9667

g – grama; R – réplica.

Tabela 4 – Controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Controle					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
16 _{R2}	56,49	X			1,0484
17 _{R2}	65,14	X			0,5351
18 _{R2}	54,40	X			0,9998
19 _{R2}	51,21	X			0,8675
20 _{R2}	43,58	X			0,9096
21 _{R2}	47,09	X			0,9590
22 _{R2}	57,68	X			1,0586
23 _{R2}	38,15	X			0,8903
24 _{R2}	54,35	X			0,9902
25 _{R2}	50,76	X			1,1343
26 _{R2}	42,27	X			0,8877
27 _{R2}	40,98	X			0,8550
28 _{R2}	38,08	X			0,7588
29 _{R2}	55,01	X			0,9116
30 _{R2}	49,65	X			0,8276
31 _{R2}	48,42	X			0,9746
32 _{R2}	54,33	X			0,7660
1 _{R3}	64,73	X			0,6131
2 _{R3}	49,44	X			0,9834
3 _{R3}	55,63		X		
4 _{R3}	56,84	X			0,8586
5 _{R3}	59,91	X			0,9126
6 _{R3}	50,41	X			1,0386
7 _{R3}	58,44	X			0,6958
8 _{R3}	50,25	X			0,7681
9 _{R3}	46,76	X			1,0032
10 _{R3}	46,28	X			0,8590
11 _{R3}	52,55	X			0,7885
12 _{R3}	49,75			X	
13 _{R3}	51,11	X			0,9620
14 _{R3}	42,31			X	
15 _{R3}	55,27	X			1,1776

g – grama; R – réplica.

Tabela 4 – Controle, réplicas 1, 2 e 3.
(conclusão)

Controle					
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Nada	Peso do embrião (g)
16 _{R3}	61,08	X			0,9285
17 _{R3}	63,28		X		0,3934
18 _{R3}	46,44	X			1,1509
19 _{R3}	53,51	X			1,2229
20 _{R3}	54,85	X			0,5663
21 _{R3}	40,17	X			1,2678
22 _{R3}	53,07		X		

g – grama; R – réplica.

Tabela 5 – Malformações dos embriões sem tratamento e controle.

Tratamento Réplica	Embrião	Malformação
C _{R1}	11	Encéfalo não desenvolveu corretamente; microftalmia
	15	Hemorragia por toda a cabeça
S/T _{R2}	6	Olhos e encéfalo não desenvolveram corretamente

C – controle; S/T – sem tratamento; R – réplica.

Tabela 6 – Concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continua)

Controle 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	58,77	X					1,0217	31
2 _{R1}	53,16	X					1,3078	34
3 _{R1}	48,56	X					1,1880	33
4 _{R1}	53,15	X					0,9398	32
5 _{R1}	49,57		X				0,0315	14
6 _{R1}	54,98	X					1,2166	33
7 _{R1}	58,72	X					1,2450	33
8 _{R1}	53,50	X					1,0035	32
9 _{R1}	51,40	X					0,8574	31
10 _{R1}	51,66	X					1,0863	33
11 _{R1}	47,39		X				0,2891	29

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 6 – Concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Controle 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
12 _{R1}	52,66	X					1,0213	32
13 _{R1}	56,14				X			
14 _{R1}	52,68	X					1,3182	34
15 _{R1}	49,48	X					1,0964	32
16 _{R1}	54,05	X					1,0944	32
17 _{R1}	51,61	X					1,2472	34
18 _{R1}	50,30	X					1,2592	34
19 _{R1}	55,16	X					1,1017	31
20 _{R1}	49,12	X					1,4004	35
21 _{R1}	52,12	X					1,2354	33
1 _{R2}	55,86	X					1,0407	32
2 _{R2}	49,28		X				Não coletado	
3 _{R2}	56,55	X					1,1676	33
4 _{R2}	51,28	X					0,9910	31
5 _{R2}	54,12		X				0,6377	29
6 _{R2}	60,45	X					0,6048	30
7 _{R2}	51,17	X					0,7034	30
8 _{R2}	55,89	X					0,9156	31
9 _{R2}	45,90	X					0,8626	30
10 _{R2}	57,99	X					0,1317	24
11 _{R2}	55,97	X					1,2326	34
12 _{R2}	54,37	X					1,1025	33
13 _{R2}	55,76	X					1,0958	32
14 _{R2}	61,09					X		
15 _{R2}	55,72	X					1,0595	32
16 _{R2}	44,33	X					1,0896	32
17 _{R2}	48,55	X					0,9416	32
18 _{R2}	62,14	X					1,0762	32
19 _{R2}	48,41	X					1,0768	32
20 _{R2}	54,57	X					0,9408	31
1 _{R3}	49,63	X					0,7878	31

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 6 – Concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
2 _{R3}	49,91	X					0,9980	32
3 _{R3}	54,97	X					0,8170	31
4 _{R3}	57,76	X					0,9358	32
5 _{R3}	42,81	X					0,8669	31
6 _{R3}	45,68	X					0,8919	31
7 _{R3}	46,40	Podre						
8 _{R3}	49,00	X					0,6297	30
9 _{R3}	58,34	X					0,6870	30
10 _{R3}	49,58	Podre						
11 _{R3}	63,95	X					0,9415	32
12 _{R3}	58,91		X				0,3953	29
13 _{R3}	57,66	X					1,0524	32
14 _{R3}	43,78	X					0,9322	32
15 _{R3}	43,87				X			
16 _{R3}	47,37	X					1,2191	34
17 _{R3}	49,00	X					1,1628	33
18 _{R3}	45,23	X					0,9753	32
19 _{R3}	43,81	X					1,0074	32
20 _{R3}	40,61	X					0,7034	30

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 7 – Concentração de 100 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	46,73	X					1,3332	35
2 _{R1}	54,09	X					0,7563	30
3 _{R1}	53,98	X					1,2608	33
4 _{R1}	53,82		X				0,1435	25

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 7 – Concentração de 100 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)

Tratado 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
5 _{R1}	50,23	X					1,3770	35
6 _{R1}	55,95	X					0,9134	31
7 _{R1}	49,75					X		
8 _{R1}	48,79					X		
9 _{R1}	54,44	X					1,0816	32
10 _{R1}	51,24					X		
11 _{R1}	58,02	X					1,0067	32
12 _{R1}	53,52	X					1,0088	31
13 _{R1}	49,05	X					0,6304	29
14 _{R1}	56,89			X				
15 _{R1}	55,41	X					0,9569	32
16 _{R1}	53,82			X				
17 _{R1}	50,09	X					0,9435	32
18 _{R1}	51,44	X					0,8816	30
19 _{R1}	43,67	X					1,3750	35
20 _{R1}	49,35	X					0,9761	32
21 _{R1}	52,01		X				0,1399	25
1 _{R2}	52,96	X					0,7972	30
2 _{R2}	49,67	X					1,0066	33
3 _{R2}	47,71	X					0,9899	32
4 _{R2}	47,28	X					0,5261	30
5 _{R2}	55,59		X				0,7323	29
6 _{R2}	51,23	X					0,8986	31
7 _{R2}	55,09	X					0,9530	31
8 _{R2}	57,69	X					0,9458	32
9 _{R2}	50,37	X					0,6978	30
10 _{R2}	50,88		X				Não coletado	
11 _{R2}	48,53	X					0,8714	31
12 _{R2}	53,17	X					0,9553	32
13 _{R2}	52,02					X		
14 _{R2}	52,33	X					1,0307	32

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 7 – Concentração de 100 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 100 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
15 _{R2}	52,15		X				Não coletado	
16 _{R2}	62,79	X					1,2326	33
17 _{R2}	54,92	X					1,1187	33
18 _{R2}	58,48	X					1,0749	32
19 _{R2}	56,02	X					0,9133	31
20 _{R2}	59,05	X					0,8960	31
21 _{R2}	55,11			X				
1 _{R3}	52,50	X					1,0672	33
2 _{R3}	49,28					X		
3 _{R3}	50,11	X					1,2026	33
4 _{R3}	51,45	X					0,9173	32
5 _{R3}	47,79	X					0,8547	30
6 _{R3}	47,59	X					1,0327	32
7 _{R3}	40,66	X					0,7207	30
8 _{R3}	47,66	Podre						
9 _{R3}	63,82	X					0,9364	31
10 _{R3}	66,24	X					0,6400	30
11 _{R3}	57,87		X				0,4238	29
12 _{R3}	55,71		X				Não peguei	13
13 _{R3}	62,06	X					1,0243	32
14 _{R3}	45,77		X				Não peguei	
15 _{R3}	44,97				X			
16 _{R3}	55,80	Podre						
17 _{R3}	47,78	X					1,0218	32
18 _{R3}	47,32	Podre						
19 _{R3}	55,53					X		
20 _{R3}	55,92					X		
21 _{R3}	49,09	X					0,9131	31

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 8 – Concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 300 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	56,94	X					1,0588	32
2 _{R1}	52,09	X					0,9516	32
3 _{R1}	65,01	X					0,9354	31
4 _{R1}	52,58	X					0,7938	30
5 _{R1}	56,11	X					1,0944	32
6 _{R1}	51,79	X					0,9236	32
7 _{R1}	54,04		X				0,4433	28
8 _{R1}	51,12	X					0,8357	30
9 _{R1}	54,98	X					0,9481	32
10 _{R1}	55,79	X					0,7917	30
11 _{R1}	58,02	X					0,9958	32
12 _{R1}	49,25	X					0,8783	31
13 _{R1}	52,21	X					1,4735	34
14 _{R1}	48,53					X		
15 _{R1}	49,02	X					1,0362	32
16 _{R1}	60,79	X					0,9471	31
17 _{R1}	50,07	X					1,0054	32
18 _{R1}	54,89	X					1,1202	33
1 _{R2}	51,67	X					0,9674	32
2 _{R2}	45,17	X					1,1445	33
3 _{R2}	47,66	X					1,1121	33
4 _{R2}	45,23	X					0,9426	32
5 _{R2}	50,02	X					1,0984	32
6 _{R2}	50,63			X				
7 _{R2}	46,28	X					1,2603	34
8 _{R2}	52,30	X					0,8341	30
9 _{R2}	60,83	X					0,8661	31
10 _{R2}	58,66	X					1,0889	33
11 _{R2}	56,16	X					1,0438	32
12 _{R2}	50,48	X					1,1673	33
13 _{R2}	55,13	X					1,2014	33
14 _{R2}	50,32	X					1,1487	33

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 8 – Concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 300 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
15 _{R2}	56,71	X					0,9124	32
16 _{R2}	48,41	X					1,1435	33
17 _{R2}	52,00	X					1,0833	32
18 _{R2}	54,24	X					1,0221	32
19 _{R2}	56,36	X					1,2317	34
20 _{R2}	47,36	X					1,2602	34
1 _{R3}	55,35	X					0,8338	32
2 _{R3}	59,48	X					1,0570	32
3 _{R3}	50,06	X					1,1032	33
4 _{R3}	54,45	X					1,1773	34
5 _{R3}	50,00	X					1,2134	33
6 _{R3}	58,78	X					0,9724	32
7 _{R3}	52,38	X					1,1111	33
8 _{R3}	48,18	X					1,1433	33
9 _{R3}	50,42	X					1,0368	33
10 _{R3}	60,05	X					0,9565	32
11 _{R3}	62,36	X					0,7744	31
12 _{R3}	51,97	X					0,9804	32
13 _{R3}	52,52	X					0,9992	32
14 _{R3}	55,55	X					0,9820	32
15 _{R3}	48,66	X					1,1730	32
16 _{R3}	46,37	X					0,9392	31
17 _{R3}	63,40	X					0,9242	32
18 _{R3}	60,95				X			
19 _{R3}	51,16	X					1,1375	34
20 _{R3}	54,41	X					1,0570	33
21 _{R3}	57,89	X					0,8177	31

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 9 – Concentração de 300 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 300 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	56,90		X				0,8075	29
2 _{R1}	55,71		X				0,6411	28
3 _{R1}	52,82	X					0,6927	30
4 _{R1}	60,64	X					0,8918	31
5 _{R1}	56,54	X					0,7891	30
6 _{R1}	45,51	X					1,1929	33
7 _{R1}	52,58	X					0,9809	30
8 _{R1}	51,47					X		
9 _{R1}	56,30	X					0,8081	30
10 _{R1}	58,80	X					0,8123	30
11 _{R1}	57,48	X					0,9053	31
12 _{R1}	51,04			X				
13 _{R1}	49,72	X					0,8484	31
14 _{R1}	40,11	X					1,0375	33
15 _{R1}	51,42	X					0,9502	32
16 _{R1}	52,19		X				Não coletado	
17 _{R1}	47,07		X				0,4039	28
18 _{R1}	55,99	X					1,0903	33
1 _{R2}	58,00	X					1,1056	33
2 _{R2}	55,59	X					1,2959	34
3 _{R2}	50,51	X					0,9264	31
4 _{R2}	51,67	X					1,0164	32
5 _{R2}	55,12	X					1,2371	33
6 _{R2}	59,97			X				
7 _{R2}	56,91	X					1,1679	34
8 _{R2}	53,39				X			
9 _{R2}	56,51	X					0,9220	30
10 _{R2}	56,99	X					1,1477	34
11 _{R2}	65,04	X					0,9868	31
12 _{R2}	54,71					X		
13 _{R2}	61,54	Podre						

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 9 – Concentração de 300 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 300 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
14 _{R2}	66,16	X					0,9697	31
15 _{R2}	48,97		X				0,4454	28
16 _{R2}	54,64	X					0,9957	32
17 _{R2}	50,25				X			
18 _{R2}	57,06			X				
19 _{R2}	50,40	X					0,6683	30
20 _{R2}	52,25		X				1,2041	32
21 _{R2}	57,75					X		
1 _{R3}	45,59		X				0,7340	29
2 _{R3}	38,74		X				0,2025	24
3 _{R3}	46,56	X					1,1467	33
4 _{R3}	51,97	X					1,3520	34
5 _{R3}	43,45			X				
6 _{R3}	43,61		X				Não coletado	
7 _{R3}	50,18	X					1,3598	34
8 _{R3}	61,38	X					0,9744	32
9 _{R3}	61,14	X					0,9453	32
10 _{R3}	61,64	X					1,0498	33
11 _{R3}	53,31		X				Não coletado	
12 _{R3}	53,11	X					1,4679	34
13 _{R3}	47,57	X					1,1744	33
14 _{R3}	51,05					X		
15 _{R3}	52,35	X					0,9665	32
16 _{R3}	66,06	X					1,1519	33
17 _{R3}	56,52	X					1,0898	32
18 _{R3}	51,59	X					0,9528	32
19 _{R3}	59,88			X				
20 _{R3}	52,70	X					0,9357	32
21 _{R3}	57,57	X					0,9525	32

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 10 – Concentração de 500 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	46,31	X					1,1645	33
2 _{R1}	52,61	X					1,0673	33
3 _{R1}	58,18	X					1,0637	32
4 _{R1}	66,01	X					1,0344	33
5 _{R1}	56,22					X		
6 _{R1}	47,72	X					1,0330	32
7 _{R1}	56,92					X		
8 _{R1}	52,97	Podre						
9 _{R1}	45,52	X					0,8862	31
10 _{R1}	47,19	X					0,8771	31
11 _{R1}	51,37	X					0,9295	31
12 _{R1}	56,46	X					0,9880	32
13 _{R1}	57,54	X					0,9246	31
14 _{R1}	61,86	X					1,0892	33
15 _{R1}	66,23	X					1,0578	33
16 _{R1}	44,54				X			
17 _{R1}	50,12		X				Não coletado	
18 _{R1}	49,65	X					0,8754	32
19 _{R1}	39,40	X					0,8255	31
20 _{R1}	41,93	X					0,8256	30
1 _{R2}	58,03	X					0,9242	30
2 _{R2}	55,08					X		
3 _{R2}	46,39	X					0,9746	32
4 _{R2}	49,27	X					1,0133	33
5 _{R2}	54,80	X					0,8104	31
6 _{R2}	60,60	X					1,0431	33
7 _{R2}	47,41	X					1,0560	33
8 _{R2}	48,78	X					1,0715	33
9 _{R2}	52,43	X					0,4556	29
10 _{R2}	56,21	X					1,1959	34
11 _{R2}	44,66	X					1,2015	33

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 10 – Concentração de 500 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)

Controle 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
12 _{R2}	51,57	X					0,8380	31
13 _{R2}	44,75	X					0,9923	32
14 _{R2}	53,94	X					0,9702	32
15 _{R2}	49,40	X					0,9975	32
16 _{R2}	48,21	X					1,0987	32
17 _{R2}	50,46	X					0,8593	32
18 _{R2}	53,55		X				Não coletado	
19 _{R2}	46,89	X					1,0415	32
20 _{R2}	51,32					X		
21 _{R2}	44,74	X					1,0919	32
1 _{R3}	43,81	X					0,9206	33
2 _{R3}	59,90	X					1,1345	33
3 _{R3}	48,75		X				Não coletado	
4 _{R3}	46,14		X				Não coletado	
5 _{R3}	56,19	X					0,9413	31
6 _{R3}	55,85	X					1,1148	33
7 _{R3}	55,15					X		
8 _{R3}	51,30	X					0,9679	32
9 _{R3}	47,21	X					0,9797	32
10 _{R3}	61,50	X					0,9528	32
11 _{R3}	51,86	X					0,7829	30
12 _{R3}	50,27	X					0,9092	32
13 _{R3}	64,01	X					1,1034	33
14 _{R3}	53,56	X					0,8063	30
15 _{R3}	60,15	X					0,8672	31
16 _{R3}	59,90	X					1,0503	33
17 _{R3}	58,80		X				0,5153	28
18 _{R3}	59,16	X					0,8010	31
19 _{R3}	50,01	X					1,0959	33

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 10 – Concentração de 500 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.
(conclusão)

Controle 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
20 _{R3}	56,34	X					0,9748	32
21 _{R3}	56,70	X					1,0012	33

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 11 – Concentração de 500 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.
(continua)

Tratado 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	58,84	X					0,9242	32
2 _{R1}	52,45		X				0,0291	20
3 _{R1}	41,44	X					1,1367	33
4 _{R1}	41,66	X					1,0459	32
5 _{R1}	51,25	X					1,1913	33
6 _{R1}	53,63		X				Não coletado	9/14*
7 _{R1}	47,47	X					0,9529	33
8 _{R1}	52,87		X				0,1767	25
9 _{R1}	56,15		X				0,5081	29
10 _{R1}	55,36		X				1,0082	32
11 _{R1}	46,43	X					0,9010	31
12 _{R1}	54,17	X					0,6892	30
13 _{R1}	42,20	X					1,1943	33
14 _{R1}	50,07	X					0,9835	32
15 _{R1}	52,57		X				0,0696	20
16 _{R1}	59,37				X			
17 _{R1}	47,80	Podre						
18 _{R1}	51,65		X				0,0458	20
19 _{R1}	49,20	X					1,0584	32
20 _{R1}	61,22			X				
1 _{R2}	51,82			X				
2 _{R2}	53,37		X				0,6001	30

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica; * – o embrião apresentava características de ambos estadiamentos.

Tabela 11 – Concentração de 500 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Tratado 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
3 _{R2}	47,64	X					0,9278	32
4 _{R2}	56,09	X					1,0942	33
5 _{R2}	48,55					X		
6 _{R2}	57,72	X					0,9643	32
7 _{R2}	54,57					X		
8 _{R2}	46,97			X				
9 _{R2}	56,05	X					0,9593	32
10 _{R2}	58,24		X				Não coletado	
11 _{R2}	47,51	X					0,9062	31
12 _{R2}	55,26	X					1,0422	32
13 _{R2}	45,01	X					0,8597	30
14 _{R2}	54,54	X					0,5161	29
15 _{R2}	48,63	X					0,6717	30
16 _{R2}	49,15		X				Não coletado	
17 _{R2}	48,51	X					1,0446	32
18 _{R2}	51,01	X					1,1086	32
19 _{R2}	54,63		X				0,2267	
20 _{R2}	49,55			X				
21 _{R2}	55,50		X				0,8258	30
1 _{R3}	53,62	X					1,1827	33
2 _{R3}	51,23	X					1,2757	33
3 _{R3}	50,85		X				0,1762	25
4 _{R3}	45,27		X				Não coletado	
5 _{R3}	41,46		X				Não coletado	
6 _{R3}	43,59		X				Não coletado	
7 _{R3}	55,92		X				Não coletado	
8 _{R3}	62,03		X				Não coletado	

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 11 – Concentração de 500 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 500 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
9 _{R3}	61,22	X					1,3386	34
10 _{R3}	52,39	X					1,0454	32
11 _{R3}	57,15	X					0,9119	31
12 _{R3}	59,60	X					0,7594	30
13 _{R3}	56,56	X					1,0408	33
14 _{R3}	53,21			X				
15 _{R3}	52,25			X				
16 _{R3}	40,17	X					0,8841	31
17 _{R3}	55,68	X					0,9236	32
18 _{R3}	55,50		X				Não coletado	
19 _{R3}	55,25	X					1,0785	33
20 _{R3}	62,20		X				Não coletado	
21 _{R3}	53,59	X					1,0408	33

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 12 – Concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	47,84				X			
2 _{R1}	42,70				X			
3 _{R1}	52,28				X			
4 _{R1}	51,98	X					1,2491	34
5 _{R1}	48,24	X					1,0330	32
6 _{R1}	48,76	X					1,2095	33
7 _{R1}	57,39	X					0,9052	32
8 _{R1}	50,81	X					1,0816	32
9 _{R1}	52,63	X					1,1750	33
10 _{R1}	46,68				X			
11 _{R1}	54,22	X					0,7139	30

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 12 – Concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Controle 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
12 _{R1}	45,69	X					0,8510	30
13 _{R1}	50,72	X					1,0613	33
14 _{R1}	50,23	X					1,0623	33
15 _{R1}	53,66					X		
16 _{R1}	48,49	X					1,0748	33
17 _{R1}	59,64	X					1,0721	32
18 _{R1}	61,68					X		
19 _{R1}	58,57	X					1,2303	34
20 _{R1}	62,41	X					1,1035	33
1 _{R2}	47,68	X					1,1366	34
2 _{R2}	61,30	X					1,2516	34
3 _{R2}	54,75				X			
4 _{R2}	50,03	X					1,2408	33
5 _{R2}	63,55		X				0,9685	31
6 _{R2}	49,97	X					1,2709	34
7 _{R2}	48,78	X					0,9638	32
8 _{R2}	45,39	X					0,7620	30
9 _{R2}	50,54	X					0,8616	31
10 _{R2}	47,62	X					0,9296	30
11 _{R2}	57,25	X					0,9936	32
12 _{R2}	59,54	X					0,8298	31
13 _{R2}	57,04	X					0,9559	33
14 _{R2}	51,18	X					0,9606	32
15 _{R2}	47,19		X				0,0060	14
16 _{R2}	46,39	X					0,9701	32
17 _{R2}	48,88	X					1,0856	33
18 _{R2}	59,77	X					1,2208	33
19 _{R2}	51,75	X					1,2044	34
20 _{R2}	54,93	X					0,9360	32
1 _{R3}	59,97	X					0,8825	31
2 _{R3}	54,83					X		
3 _{R3}	58,33		X				0,3997	28

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 12 – Concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.
(conclusão)

Controle 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
4 _{R3}	54,69	X					1,0175	32
5 _{R3}	68,33	X					0,7511	30
6 _{R3}	50,80		X				1,1153	31
7 _{R3}	52,21	X					0,9113	31
8 _{R3}	55,74	X					1,0135	32
9 _{R3}	44,26	X					1,0125	32
10 _{R3}	55,35	X					0,8287	31
11 _{R3}	55,26	X					0,6087	30
12 _{R3}	58,45				X			
13 _{R3}	52,67	X					1,1487	33
14 _{R3}	53,18	X					1,2150	33
15 _{R3}	51,86	X					1,0430	33
16 _{R3}	56,96	X					1,1048	32
17 _{R3}	56,61	X					1,0087	33
18 _{R3}	63,45	X					0,8783	30
19 _{R3}	50,39	X					1,1700	33
20 _{R3}	57,72		X				1,2358	30

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 13 – Concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.
(continua)

Tratado 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
1 _{R1}	57,65	X					0,8619	30
2 _{R1}	54,15					X		
3 _{R1}	61,72	X					0,6654	30
4 _{R1}	50,57			X				
5 _{R1}	63,70	X					0,9054	32
6 _{R1}	51,53	X					0,6448	29
7 _{R1}	65,86				X			
8 _{R1}	53,68		X				1,0548	30

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 13 – Concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.
(continuação)

Tratado 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
9 _{R1}	51,16					X		
10 _{R1}	48,94	X					0,637	29
11 _{R1}	45,53					X		
12 _{R1}	55,94					X		
13 _{R1}	48,00		X				0,3723	29
14 _{R1}	61,87	X					0,8564	32
15 _{R1}	56,38					X		
16 _{R1}	49,20				X			
17 _{R1}	51,21	Podre						
18 _{R1}	50,57	X					1,0579	33
19 _{R1}	51,99	X					0,9466	32
20 _{R1}	55,77				X			
21 _{R1}	48,53	X					0,7566	30
1 _{R2}	52,38				X			
2 _{R2}	54,91	X					1,2069	33
3 _{R2}	50,86	X					0,9047	31
4 _{R2}	49,67		X				0,7235	30
5 _{R2}	57,32	X					1,0206	32
6 _{R2}	55,89		X				1,4521	33
7 _{R2}	46,53				X			
8 _{R2}	49,74	X					0,8364	30
9 _{R2}	51,14			X				
10 _{R2}	52,26	X					1,3034	34
11 _{R2}	50,81	X					1,0047	32
12 _{R2}	46,69					X		
13 _{R2}	48,91	X					0,9771	32
14 _{R2}	45,92			X				
15 _{R2}	61,72	X					1,0710	32
16 _{R2}	50,87	X					0,9381	32
17 _{R2}	48,43			X				

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 13 – Concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.
(conclusão)

Tratado 750 µL/mL								
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto com embrião	Morto com sangue	Indefinido	Infértil	Peso do embrião (g)	Estágio HH
18 _{R2}	51,65	X					1,1346	33
19 _{R2}	60,31	X					1,1025	33
20 _{R2}	46,08				X			
21 _{R2}	55,07					X		
1 _{R3}	57,47	X					0,5065	28
2 _{R3}	50,53	X					0,9193	32
3 _{R3}	63,48		X				0,0486	24
4 _{R3}	51,74	X					0,5694	29
5 _{R3}	56,95			X				
6 _{R3}	56,06		X				0,0801	
7 _{R3}	54,79	X					0,9255	31
8 _{R3}	46,91			X				
9 _{R3}	54,47	X					0,9252	32
10 _{R3}	62,05		X				Não coletado	
11 _{R3}	53,64	X					0,9633	32
12 _{R3}	47,17		X				0,2294	25
13 _{R3}	62,13		X				0,9230	30
14 _{R3}	58,61		X				0,0839	25
15 _{R3}	54,18	X					0,8591	32
16 _{R3}	60,20	X					0,9982	32
17 _{R3}	52,51	X					1,1626	33
18 _{R3}	49,96	X					0,7418	30
19 _{R3}	48,96	X					1,0448	32
20 _{R3}	51,83	X					1,0247	32
21 _{R3}	51,28	X					1,0593	32

µL/mL – microlitro/mililitro; g – grama; HH – Hamburger & Hamilton (1951); R – réplica.

Tabela 14 – Ovos inférteis e indefinidos brutos, N amostral e percentual de ovos inférteis e indefinidos segundo as diferentes concentrações, tratamentos e réplicas.

Concentração ($\mu\text{L/mL}$) _{Réplica}	Controle			Tratado		
	Ovos inférteis e indefinidos brutos	N amostral	% de ovos inférteis e indefinidos	Ovos inférteis e indefinidos brutos	N amostral	% de ovos inférteis e indefinidos
100 _{R1}	1	21	4,76	3	21	14,29
100 _{R2}	3	20	15,00	7	21	33,33
100 _{R3}	1	20	5,00	1	21	4,76
300 _{R1}	1	18	5,56	1	18	5,56
300 _{R2}	0	20	0,00	5	21	23,81
300 _{R3}	1	21	4,76	1	21	4,76
500 _{R1}	4	20	20,00	2	20	10,00
500 _{R2}	2	21	9,52	2	21	9,52
500 _{R3}	1	21	4,76	0	21	0,00
750 _{R1}	6	20	30,00	9	21	42,86
750 _{R2}	1	20	5,00	5	21	23,81
750 _{R3}	2	20	10,00	0	21	0,00

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; R – réplica.

Tabela 15 – Subtração da taxa de mortalidade dos embriões tratados e controles (em porcentagem) segundo as diferentes concentrações e réplicas.

% de mortalidade nas concentrações ($\mu\text{L/mL}$)				
Réplica	100	300	500	750
1	12,22	23,53	38,19	25,00
2	15,55	20,00	36,84	20,72
3	9,47	30,00	32,62	21,43

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro.

Tabela 16 – Malformações encontradas na concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(continua)

Concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$		
Tratamento	Embrião	Malformações
Réplica		
C - R1	5 _M	Hemorragia no coração
	11 _M	Ausência de simetria bilateral cefálica; membros com tamanho menor; cauda atrofiada; ciclopia; hemorragia no lado direito do corpo e órgãos

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 16 – Malformações encontradas na concentração de 100 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(conclusão)

Concentração de 100 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
T - R1	4 _M	Desenvolvimento cefálico incompleto; tronco torcionado
	21 _M	Desenvolvimento cefálico incompleto; cauda atrofiada; microftalmia (ambos olhos)
C - R2	12 _M	Hemorragia no lado direito da cabeça
	18 _V	Cauda atrofiada
T - R2	11 _M	Hemorragia na cabeça, olhos, região caudal e tronco no lado esquerdo
C - R3	5 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), cabeça e órgãos
	6 _V	Ausência de forma cranial e mandíbula; coração ectópico; anaftalmia
T - R3	5 _M	Microftalmia (olho direito, não pigmentou corretamente); hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), cabeça e órgãos

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 17 – Malformações encontradas na concentração de 300 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(continua)

Concentração de 300 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
C - R1	7 _M	Hemorragia por todo o corpo
	9 _V	Coração ectópico
	13 _V	Hemorragia nos órgãos
T - R1	1 _M	Parte superior do bico não desenvolveu completamente; hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente)
	2 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente)
	17 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente)
T - R2	2 _V	Hemorragia em volta da íris esquerda
	15 _M	Lado direito cefálico menor; microftalmia (olho direito); hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente) e órgãos
	20 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente) e órgãos

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 17 – Malformações encontradas na concentração de 300 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(conclusão)

Concentração de 300 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
C – R3	15 _V	Região frontal cefálica inchada
	1 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), cabeça e órgãos
T – R3	2 _M	Microftalmia (olho esquerdo); hemorragia na região torácica e pescoço
	11 _M	Ausente
	20 _V	Órgãos protuberantes

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 18 – Malformações encontradas na concentração de 500 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(continua)

Concentração de 500 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
T - R1	2 _M	Tronco retorcido
	6 _M	Região cefálica não desenvolveu completamente; tronco plano; anaftalmia
	9 _M	Olhos não pigmentaram corretamente
	10 _M	Órgãos protuberantes; olhos não pigmentaram corretamente; hemorragia por todo o corpo e órgãos
T - R2	2 _M	Olhos não pigmentaram corretamente; hemorragia na região inferior esquerda do corpo
	19 _M	Bico superior ausente; tronco com ângulo mais aberto; cauda atrofiada; microftalmia (ambos olhos não formaram corretamente); hemorragia na cabeça (lado esquerdo) e órgãos
	21 _M	Bico superior ausente; olhos não pigmentaram corretamente; hemorragia por todo o corpo (principalmente na cabeça e lado direito) e órgãos
C - R4	17 _M	Hemorragia nos olhos e órgãos, espalhada pelas pernas, asas e pescoço

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 18 – Malformações encontradas na concentração de 500 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(conclusão)

Concentração de 500 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
T - R4	1 _V	Órgãos intestinais protuberantes
	2 _V	Órgãos protuberantes; pata esquerda voltada para cima; cauda atrofiada
	3 _M	Microftalmia (olho esquerdo); hemorragia na cabeça
	12 _V	Hemorragia na região frontal da cabeça
	17 _V	Órgãos protuberantes; cauda atrofiada

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 19 – Malformações encontradas na concentração de 750 µL/mL, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(continua)

Concentração de 750 µL/mL		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
T - R1	3 _V	Encéfalo amassado e sem pele recobrimdo
	8 _M	Bico superior incompleto; órgãos protuberantes; hemorragia por todo o corpo e órgãos
	13 _M	Cauda atrofiada; microftalmia (olho direito); hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente) e órgãos
C - R2	5 _M	Bico superior menor; cauda menor; olhos não pigmentaram corretamente; hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), órgãos e cabeça
T - R2	4 _M	Bico superior incompleto; olhos não pigmentaram corretamente; hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), órgãos e cabeça
	6 _M	Bico superior incompleto; hemorragia por todo o corpo
C - R3	3 _M	Hemorragia por todo o corpo (lado esquerdo principalmente), órgãos e cabeça
	6 _M	Hemorragia por todo o corpo, cabeça e órgãos
	20 _M	Hemorragia por todo o corpo, cabeça e órgãos

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 19 – Malformações encontradas na concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$, em seus respectivos tratamentos e réplicas.

(conclusão)

Concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$		
Tratamento Réplica	Embrião	Malformações
T - R3	3 _M	Hemorragia no lado esquerdo do corpo
	6 _M	Ausência cefálica; tronco deformado; anaftalmia
	12 _M	Hemorragia no lado esquerdo do corpo
	13 _M	Hemorragia na região frontal da cabeça e órgãos
	14 _M	Ausência de mandíbula e encéfalo; anaftalmia

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; R – réplica; M – morto; V – vivo.

Tabela 20 – Subtração da taxa de malformação dos embriões vivos tratados e controles (em porcentagem) segundo as diferentes concentrações e réplicas.

% de malformação nas concentrações
($\mu\text{L/mL}$)

Réplica	100	300	500	750
1	0,00	-12,50	0,00	11,11
2	-6,25	8,33	0,00	0,00
3	-5,88	2,14	36,36	0,00

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro.

Tabela 21 – Número de embriões mortos em cada estágio de desenvolvimento (HH) segundo as concentrações e tratamentos.

Embriões mortos nas diferentes concentrações ($\mu\text{L/mL}$)										
Estágio HH	100		300		500		750		Total	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
13		1								1
14	1						1		2	
20						3				3
24				1				1		2
25		2				2		2		6
28			1	3	1		1		3	3
29	3	2		2		2		1	3	6
30							1	3	1	5
31							2		2	
32				1		1				2
33								1		1

$\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado.

Tabela 22 – Número de embriões vivos em cada estágio de desenvolvimento (HH) segundo as concentrações e tratamentos.

Estágio HH	Embriões vivos nas diferentes concentrações (µL/mL)									
	100		300		500		750		Total	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
24	1								1	
28								1		1
29		1			1	1		3	1	5
30	6	8	4	7	4	4	7	5	21	24
31	10	9	7	6	10	4	5	2	32	21
32	19	14	24	10	17	12	13	16	73	52
33	8	6	14	9	17	10	15	5	54	30
34	6		6	6	1	1	6	1	19	8
35	1	3							1	3

µL/mL – microlitro/mililitro; C – controle; T – tratado.

Tabela 23 – Subtração das médias dos estágios (HH) dos embriões vivos tratados e controles segundo as diferentes concentrações e réplicas

Réplica	Estágio (HH) nas concentrações (µL/mL)			
	100	300	500	750
1	-0,65	-0,46	0,23	-1,65
2	-0,11	-0,44	-0,26	-0,17
3	0,26	0,36	0,27	-0,43

HH – Hamburger & Hamilton (1951); µL/mL – microlitro/mililitro.

Tabela 24 – Subtração das médias dos pesos (em gramas) dos embriões vivos tratados e controles segundo as diferentes concentrações e réplicas

Réplica	Peso (g) nas concentrações (µL/mL)			
	100	300	500	750
1	-0,1109	-0,0702	0,0316	-0,2441
2	0,0262	-0,0438	-0,0621	0,0117
3	-0,0114	0,0891	0,0788	-0,0730

g – grama; µL/mL – microlitro/mililitro.

Tabela 25 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 100 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
Réplica										
1 _{R1}	11,25	3,94	7,84	12,12	11,24	10,74	5,20	9,55	11,00	11,93
2 _{R1}	10,74	4,72	6,65	8,47	9,60	11,13	4,91	6,40	8,60	10,12
3 _{R1}	11,31	4,85	8,26	11,68	10,03	11,22	5,34	7,62	11,36	9,59
4 _{R1}	10,72	4,73	6,24	9,18	10,16	10,60	4,58	6,00	8,52	10,13
5 _{R1}	10,74	4,86	7,33	11,23	10,84	11,44	5,07	6,95	10,59	10,99
6 _{R1}	10,98	4,94	6,81	8,78	9,57	10,70	4,64	6,03	8,53	9,56
7 _{R1}	12,25	4,52	7,53	11,21	10,63	12,04	4,98	8,50	8,86	10,35
8 _{R1}	11,15	4,61	6,19	9,16	10,09	11,30	4,77	6,45	8,80	8,83
9 _{R1}	10,58	4,43	5,85	8,49	9,43	10,47	4,87	5,58	7,86	9,85
10 _{R1}	11,99	5,15	7,42	11,08	10,93	11,02	4,99	8,18	10,76	10,87
11 _{R1}	10,23	4,70	5,78	8,39	9,46	9,97	4,63	5,50	7,66	9,39
12 _{R1}	10,88	4,80	6,35	10,68	9,60	10,59	4,65	7,65	10,68	9,86
13 _{R1}	11,36	4,91	6,71	10,97	10,81	11,21	4,95	6,84	11,02	10,48
14 _{R1}	10,50	4,37	5,33	7,15	8,88	10,12	4,31	5,68	7,63	8,82
15 _{R1}	10,23	4,79	6,06	9,49	9,55	9,77	4,62	6,22	8,24	9,67
16 _{R1}	10,82	4,31	7,20	11,07	10,27	11,61	5,19	6,85	9,46	10,31
17 _{R1}	10,91	5,18	7,08	10,07	10,81	10,81	4,79	7,28	11,34	11,49
18 _{R1}	10,44	4,39	5,61	8,04	9,31	10,16	4,45	5,09	8,13	9,55
1 _{R2}	9,33	4,54	6,46	10,50	8,97	9,45	3,82	6,97	9,92	9,49
2 _{R2}	11,40	4,77	6,47	8,43	10,67	11,13	4,78	6,64	7,94	10,39
3 _{R2}	10,04	4,13	5,13	4,72	8,70	9,81	4,19	4,80	6,69	9,37
4 _{R2}	11,09	4,98	6,63	8,31	9,18	10,81	4,68	6,06	9,09	9,41
5 _{R2}	9,63	4,13	5,23	8,02	9,28	10,09	4,30	5,84	8,88	9,05
6 _{R2}	10,17	4,01	6,66	9,69	9,25	10,34	4,56	6,64	9,60	9,25
7 _{R2}	11,00	4,93	6,09	8,73	10,04	10,76	4,40	5,94	8,99	9,78

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 25 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 100 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
8 _{R2}	10,37	4,55	6,97	10,10	8,99	10,26	4,27	5,96	9,03	8,70
9 _{R2}	9,85	4,83	6,96	9,27	10,77	10,32	5,27	6,93	10,26	10,53
10 _{R2}	10,27	4,75	5,39	7,54	9,38	10,43	4,12	5,90	7,17	9,92
11 _{R2}	10,65	4,41	6,48	10,37	9,33	10,49	4,75	6,96	10,00	10,17
12 _{R2}	11,15	5,03	6,74	9,57	10,43	11,53	5,15	6,39	10,71	10,58
13 _{R2}	10,17	4,27	6,85	9,66	10,30	10,06	4,52	6,56	8,97	9,65
14 _{R2}	9,55	4,51	5,28	7,67	9,72	10,28	4,30	5,38	8,09	9,25
15 _{R2}	10,63	4,64	6,85	10,85	10,47	10,56	4,28	7,10	11,00	10,05
16 _{R2}	5,48		4,96	6,77	8,75	6,70		5,56	6,90	8,15
17 _{R2}	4,48	1,53	2,21	2,03	7,23	4,46	1,63	2,00		6,72
1 _{R3}	10,78	4,80	6,19	8,02	8,68	11,04	4,54	5,73	7,61	9,10
2 _{R3}	11,35	4,64	5,73	8,78	8,38	11,34	5,21	6,39	9,01	10,28
3 _{R3}	10,00	4,04	4,49	5,57	8,35	10,18	3,89	4,74	6,65	8,38
4 _{R3}	11,08	5,11	6,27	9,87	10,07	11,13	4,78	7,03	9,59	9,07
5 _{R3}	10,78	5,06	6,46	8,15	9,61	10,74	4,82	5,97	8,70	8,76
6 _{R3}	10,74	5,14	5,94	8,15	9,95	10,61	4,56	6,12	8,39	9,15
7 _{R3}	10,47	4,28	6,06	8,22	9,84	10,67	4,45	5,65	8,91	8,92
8 _{R3}	10,87	4,63	5,87	8,03	9,55	10,56	4,19	5,96	8,57	8,95
9 _{R3}	11,36	5,39	8,05	11,27	10,20	11,04	4,65	8,25	11,35	10,16
10 _{R3}	9,95	4,34	5,31	8,50	9,11	9,67	4,03	5,44	7,48	8,16
11 _{R3}	9,90	4,58	5,22	6,77	8,70	9,59	4,04	4,85	6,49	8,43
12 _{R3}	9,53	4,43	5,63		8,54	9,97	4,47	5,84		8,77
13 _{R3}	10,47	3,93	6,18	8,44	9,12	10,87	4,81	6,38	8,45	9,65
14 _{R3}	10,90	5,04	6,04	8,73	9,59	10,17	4,17	5,94	9,00	9,28
15 _{R3}	9,21	3,83	4,93	5,81	8,24	9,66	4,29	5,16	6,38	8,34
16 _{R3}	10,24	4,53	5,94	9,17	7,82	10,39	4,76	6,43	8,72	9,56

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 26 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 100 $\mu\text{L/mL}$										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	11,00	4,35	5,54	9,30	9,58	10,96	4,51	5,58	8,66	8,85
2 _{R1}	10,81	4,41	5,63	8,49	9,78	10,81	5,03	6,39	8,87	9,54
3 _{R1}	9,80	3,74	4,56	5,72	8,48	9,17	4,01	3,70	5,82	8,33
4 _{R1}	10,05	4,57	5,64	9,00	9,77	10,69	4,40	5,73	8,64	9,42
5 _{R1}	10,49	5,04	6,39	9,32	9,34	10,93	5,10	5,45	8,63	9,71
6 _{R1}	10,76	4,42	6,08	9,22	9,03	10,07	4,31	5,71	8,54	8,90
7 _{R1}	9,52	4,35	4,85	7,75	9,19	10,06	3,98	4,82	8,58	9,02
8 _{R1}	11,49	5,24	8,89	12,81	11,22	12,06	5,32	9,03	13,24	11,01
9 _{R1}	12,46	4,88	8,74	12,89	10,62	11,89	4,78	7,88	13,05	10,53
10 _{R1}	11,92	4,98	6,79	11,80	11,21	11,76	4,90	7,38	10,92	10,44
11 _{R1}	10,03	4,20	5,32	6,64	8,28	10,14	4,52	5,55	6,40	8,73
12 _{R1}	11,21	5,00	8,49	12,66	11,03	11,72	5,00	8,01	12,10	10,85
13 _{R1}	10,76	4,92	6,33	10,86	10,76	11,50	4,78	7,12	10,49	11,44
14 _{R1}	10,66	4,47	5,58	8,47	9,63	10,32	4,14	5,78	7,99	8,93
1 _{R2}	7,52	3,65		4,74	6,33	7,46	3,75		4,47	7,89
2 _{R2}	10,59	4,41	5,65	9,03	8,65	10,78	4,83	6,44	9,69	9,56
3 _{R2}	10,23	4,53	6,29	7,97	8,84	10,30	4,24	5,75	8,50	9,73
4 _{R2}	9,12	4,02	4,93	6,22	8,15	9,14	3,98	4,77	6,66	8,24
5 _{R2}	9,45	4,27	4,96	7,55	8,34	9,70	4,15	5,09	6,75	8,99
6 _{R2}	9,88	3,93	6,37	8,48	9,39	9,92	4,38	6,28	8,77	8,23
7 _{R2}	9,65	4,05		7,57	8,71	9,04	4,56		7,79	8,61
8 _{R2}	9,35	3,70	4,59	6,29	8,18	9,00	4,35	4,63	5,79	8,06
9 _{R2}	10,19	4,14	6,71	9,48	7,74	10,11	4,42	6,34	10,72	8,47
10 _{R2}	10,95	4,50	7,10	10,80	10,25	11,19	4,84	7,92	9,71	10,18
11 _{R2}	9,21	4,40	6,87	8,31	8,66	9,19	3,97	5,98	8,73	9,01
12 _{R2}	9,67	4,60	6,10	8,23	9,28	9,85	4,34	6,68	9,32	8,46
13 _{R2}	9,47	4,44	5,93	7,62	9,13	9,38	4,12	5,85	8,04	7,77
14 _{R2}	10,28	4,54	6,42	10,34	9,38	10,16	4,57	6,25	9,42	9,53

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 26 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 100 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
15 _{R2}	9,69	4,70	5,60	7,42	8,90	9,92	4,46	5,78	8,40	8,85
16 _{R2}	8,20	3,75	6,10	8,78	8,30	8,25	3,51	5,76	8,05	9,11
1 _{R3}	10,84	4,91	5,94	8,73	9,71	10,53	4,70	6,23	9,31	9,47
2 _{R3}	11,14	4,84	6,17	8,78	10,16	10,50	4,43	6,05	8,78	10,39
3 _{R3}	10,84	4,60	7,18	9,24	9,28	10,95	4,59	6,59	9,61	10,50
4 _{R3}	10,19	4,03	4,98	7,06	8,82	10,19	4,40	6,04	7,51	8,99
5 _{R3}	10,09	4,49	5,14	7,25	9,15	9,95	4,01	5,58	7,04	8,62
6 _{R3}	10,27	4,29	5,86	8,06	9,64	10,13	4,13	5,72	7,78	9,57
7 _{R3}	10,03	4,37	5,14	7,56	8,78	9,96	4,87	5,48	7,14	8,86
8 _{R3}	10,92	4,96	7,00	10,82	10,64	10,70	4,56	6,72	11,47	10,14
9 _{R3}	11,18	4,84	7,54	10,71	10,95	11,46	5,65	7,60	13,04	10,97
10 _{R3}	8,38	4,08	4,80	6,03	8,45	8,64	4,25	4,40	6,28	7,82
11 _{R3}	10,88	4,73	6,62	9,39	9,09	10,75	4,16	6,03	9,93	8,99

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 27 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 300 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	10,33	4,48	6,61	9,22	9,52	10,51	4,11	6,50	8,76	9,04
2 _{R1}	11,43	4,97	7,15	9,44	10,43	11,67	5,03	6,86	9,38	10,18
3 _{R1}	10,88	4,72	6,98	8,89	9,69	10,64	4,33	6,40	10,24	9,71
4 _{R1}	11,84	4,20	7,16	12,42	9,92	12,03	4,62	7,90	12,11	10,46
5 _{R1}	12,24	5,15	7,45	10,99	10,41	12,30	4,40	7,71	11,04	10,38
6 _{R1}	10,57	4,87	6,87	10,18	9,94	11,10	4,65	6,85	9,30	9,96
7 _{R1}	9,95	3,51	6,00	8,42	9,05	9,96	4,67	6,05	8,92	9,07

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 27 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)

Controle 300 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
Réplica										
8 _{R1}	10,99	5,43	7,45	9,89	10,67	10,88	4,24	6,75	10,40	9,33
9 _{R1}	11,52	5,04	6,51	9,07	9,94	11,34	4,69	7,09	8,72	9,77
10 _{R1}	10,41	4,78	6,66	9,18	10,02	11,24	5,06	6,67	8,55	10,81
11 _{R1}	10,74	4,72	6,50	9,42	9,38	10,61	4,72	6,08	8,56	9,88
12 _{R1}	9,62	4,34	5,03	7,71	9,22	9,81	4,58	5,37	7,36	8,41
13 _{R1}	10,07	4,24	5,81	8,26	8,80	10,18	4,34	5,99	8,01	8,31
14 _{R1}	9,68	4,66	7,60	9,65	8,60	9,60	4,32	7,25	8,86	9,11
15 _{R1}	8,80	4,01	5,38	7,51	9,01	8,88	4,12	5,68	7,63	8,40
16 _{R1}	10,35	4,46	6,34	8,45	9,47	10,22	4,23	5,86	8,75	9,67
17 _{R1}	10,99	4,76	7,68	12,00	9,38	11,25	4,53	7,47	10,79	9,92
18 _{R1}	10,61	4,31	6,90	9,48	10,15	10,39	4,36	6,60	10,02	9,54
19 _{R1}	9,80		6,90	9,27	9,41	10,01		6,48	9,38	10,11
1 _{R2}	11,14	4,55	7,01	8,84	9,48	11,16	4,44	7,14	9,73	9,45
2 _{R2}	10,43	4,81	5,87	8,07	9,52	10,72	4,40	5,61	8,23	9,92
3 _{R2}	11,23	5,13	6,78	10,20	9,73	11,44	5,11	7,41	9,27	8,91
4 _{R2}	10,85	4,34	5,99	8,55	9,57	10,81	4,42	6,70	8,55	9,89
5 _{R2}	9,86	4,22	5,28	6,77	9,15	9,94	4,05	5,03	7,23	8,66
6 _{R2}	10,74	4,71	6,64	9,58	10,31	10,64	4,62	7,00	8,87	9,93
7 _{R2}	9,82	3,41	5,77	8,33	8,61	9,88	4,52	5,94	7,39	8,60
8 _{R2}	10,53	4,57	6,25	8,39	9,65	10,53	4,72	6,26	8,50	9,16
9 _{R2}	9,62	4,16	5,56	7,38	8,11	9,51	3,88	5,69	7,48	8,07
10 _{R2}	9,28	4,24	5,83	7,74	9,38	9,26	4,24	5,88	7,91	8,76
11 _{R2}	9,74	4,27	6,38	8,62	8,52	9,72	4,53	6,03	8,27	8,96
12 _{R2}	9,28	4,33	5,08	7,02	8,65	9,39	4,38	4,33	6,88	8,81
13 _{R2}	9,76	4,36	5,87	7,39	9,13	9,78	4,25	5,59	7,34	9,04

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 27 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 300 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
Réplica										
14 _{R2}	8,60	4,32	5,28	6,11	8,03	8,58	4,08	4,84	6,14	7,48
15 _{R2}	8,62	4,23	5,80	7,30	8,06	8,58	3,98	6,42	6,21	8,64
16 _{R2}	10,77	3,98	8,27	13,51	11,76	10,71	4,45	8,19	9,56	12,65
1 _{R3}	10,06	4,46	5,81	8,27	9,28	10,27	4,46	5,47	7,26	9,49
2 _{R3}	10,57	4,48	6,65	11,00	8,61	10,44	5,04	7,12	11,29	8,92
3 _{R3}	10,57	4,29	5,71	8,18	8,53	10,68	4,40	6,51	8,49	8,55
4 _{R3}	10,73	4,44	7,11	8,93	9,17	10,60	4,99	6,32	9,07	10,16
5 _{R3}	10,34	4,69	6,38	8,51	9,43	10,09	4,54	6,52	9,75	9,37
6 _{R3}	10,62	4,81	6,64	8,90	9,55	10,25	4,78	6,55	10,53	8,64
7 _{R3}	10,87	4,13	6,09	8,78	8,90	10,62	4,29	6,22	8,42	9,25
8 _{R3}	11,43	4,62	7,97	11,74	10,58	11,28	4,95	7,94	11,23	9,79
9 _{R3}	10,97	5,18	7,19	10,47	10,48	11,09	5,07	7,28	10,42	10,13
10 _{R3}	10,71	4,79	7,01	10,69	10,37	10,04	4,70	7,26	10,87	10,39
11 _{R3}	11,05	4,84	6,81	10,25	9,15	10,38	4,22	6,62	10,07	9,04
12 _{R3}	10,84	4,71	7,16	11,47	9,24	10,80	4,15	7,01	10,04	9,44
13 _{R3}	10,35	4,63	5,20	7,45	8,59	10,03	4,36	5,31	6,43	8,89
14 _{R3}	10,39	4,83	5,57	8,86	9,30	10,85	4,83	5,93	8,87	8,50
15 _{R3}	10,44	4,71	6,72	10,15	8,93	10,41	4,68	7,22	9,29	10,38
16 _{R3}	10,40	4,33	7,49	11,36	9,25	10,61	4,99	6,84	10,34	9,52
17 _{R3}	11,06	4,82	6,93	9,88	8,83	11,10	4,26	6,10	9,38	8,80
18 _{R3}	10,42	4,98	6,87	10,86	11,16	11,30	5,10	7,59	11,19	10,86
19 _{R3}	10,04	4,68	6,85	9,80	10,02	10,43	5,43	7,58	11,57	10,46
20 _{R3}	9,71	4,37	6,26	8,43	9,46	9,49	4,30	6,67	7,70	9,55

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 28 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 300 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	9,75	4,40	5,04	6,29	8,70	9,76	4,08	4,84	6,23	8,95
2 _{R1}	11,29	4,58	6,42	9,22	9,69	11,11	4,71	6,13	8,46	9,93
3 _{R1}	10,57	3,91	5,91	7,52	9,47	10,71	4,41	6,42	8,50	10,18
4 _{R1}	11,50	4,95	7,50	11,48	9,72	11,29	4,84	7,14	11,28	10,02
5 _{R1}	10,38	4,44	5,64	8,82	9,40	10,45	4,30	5,76	7,27	9,61
6 _{R1}	10,51	4,33	5,91	8,54	9,36	10,48	4,30	6,21	8,66	9,41
7 _{R1}	11,12	4,59	8,45	10,99	11,68	11,00	4,83	7,93	12,11	10,69
8 _{R1}	10,84	4,81	5,98	7,98	10,35	10,89	5,13	6,19	8,55	10,23
9 _{R1}	10,81	4,55	8,25	11,24	10,36	10,73	4,48	7,92	11,61	11,11
10 _{R1}	10,33	4,46	7,31	10,73	9,36	10,51	4,90	7,64	10,55	10,39
11 _{R1}	10,55	4,02	7,91	10,58	10,23	10,93	5,04	8,07	11,23	10,70
12 _{R1}	9,97	4,46	6,42	8,06	9,73	9,61	4,08	5,86	8,19	9,34
1 _{R2}	10,23	4,53	5,98	7,34	9,20	10,07	4,30	5,87	7,90	8,89
2 _{R2}	9,65	3,88	5,72	8,39	9,89	9,48	4,29	5,76	7,29	9,35
3 _{R2}	9,34	4,11	5,18	7,34	8,61	9,49	3,97	5,14	7,26	8,68
4 _{R2}	10,17	4,55	7,16	10,14	9,95	9,91	4,20	7,47	9,56	9,11
5 _{R2}	9,21	3,52	5,28	6,85	7,39	9,06	3,61	5,23	7,05	7,63
6 _{R2}	10,24	4,41	6,11	7,56	9,40	10,34	4,48	5,31	7,95	9,50
7 _{R2}	10,61	4,20	6,29	8,53	10,09	10,50	4,37	6,57	8,28	9,54
8 _{R2}	9,93	4,02	5,71	7,20	8,42	9,94	4,23	5,05	7,10	9,14
9 _{R2}	9,11	4,21	5,21	6,60	8,34	9,27	3,84	5,12	6,84	8,10
10 _{R2}	8,75	3,97	5,27	6,73	9,11	9,00	4,28	5,18	8,65	9,04
11 _{R2}	11,43	5,02	7,35	10,14	10,25	11,21	4,63	6,37	10,03	9,98
12 _{R2}	9,16	3,91	5,19	6,82	8,57	9,38	4,18	5,18	7,06	9,21
1 _{R3}	11,09	4,65	6,81	9,21	9,52	11,06	4,55	5,87	9,77	9,98
2 _{R3}	11,26	5,02	7,65	11,09	10,34	11,15	4,52	7,57	11,29	10,88
3 _{R3}	10,34	4,18	6,39	10,08	8,55	10,40	4,56	6,33	8,53	9,41

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 28 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 300 $\mu\text{L/mL}$										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
4 _{R3}	9,91		6,25	9,65	9,26	9,56		7,09	9,93	8,86
5 _{R3}	10,65	4,66	7,05	12,68	9,86	10,88	4,96	6,97	11,17	9,06
6 _{R3}	10,12	4,86	7,20	10,66	10,08	10,10	4,34	6,94	10,31	9,65
7 _{R3}	10,73	5,02	6,55	9,80	9,09	10,39	5,16	6,49	8,53	9,53
8 _{R3}	9,43	4,20	6,05	8,48	8,51	9,30	4,00	6,34	8,29	8,21
9 _{R3}	10,00	4,34	6,56	9,11	9,86	9,79	4,90	6,26	10,82	9,50
10 _{R3}	10,70	4,41	8,49	12,30	10,67	11,02	5,25	9,03	11,94	10,02
11 _{R3}	9,68	4,09	5,78	8,46	7,37	9,61	4,13	6,19	8,13	7,91
12 _{R3}	10,30	3,70	7,12	9,89	9,66	10,41	4,31	6,75	9,72	10,24
13 _{R3}	10,30	4,47	6,78	9,07	8,55	10,63	4,73	6,57	9,35	9,75
14 _{R3}	9,79	4,68	5,84	8,01	8,37	9,97	4,47	6,13	8,96	8,57

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 29 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 500 $\mu\text{L/mL}$										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	10,99	4,21	7,44	9,08	10,64	10,78	4,59	7,03	9,99	9,72
2 _{R1}	10,64	4,08	7,09	8,96	10,33	10,72	4,55	7,40	9,97	9,93
3 _{R1}	10,18	4,41	5,70	7,37	9,23	10,25	4,69	5,98	8,04	8,82
4 _{R1}	10,70	4,43	6,32	8,89	9,72	10,60	4,48	6,93	9,78	9,28
5 _{R1}	10,56	4,32	6,34	8,95	9,79	10,45	4,62	6,05	10,32	10,14
6 _{R1}	11,11	4,73	6,96	7,17	8,86	11,32	4,78	6,81	10,51	10,68
7 _{R1}	11,35	4,72	7,26	10,71	10,06	11,06	5,19	6,70	9,54	10,41
8 _{R1}	10,90	4,67	5,78	9,15	9,55	11,07	4,96	6,77	9,94	7,25
9 _{R1}	10,48	4,65	6,74	9,61	9,74	10,81	4,67	6,85	9,70	9,38

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 29 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)

Controle 500 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
10 _{R1}	9,40	4,61	6,52	8,83	9,69	9,19	4,35	6,26	8,50	9,60
11 _{R1}	8,96	3,91	6,10	7,71	9,02	8,95	3,97	5,78	7,97	8,85
12 _{R1}	10,07	4,10	6,97	8,88	9,21	10,11	4,52	6,43	8,87	9,88
13 _{R1}	11,15	4,72	6,89	9,51	8,52	10,60	4,86	6,09	11,89	9,40
14 _{R1}	10,98	4,56	7,00	11,32	10,60	10,74	5,18	8,05	12,15	11,09
15 _{R1}	10,82	4,56	7,00	10,04	9,81	10,73	4,80	7,19	9,82	10,36
16 _{R1}	10,35	4,42	6,71	9,54	9,96	10,15	4,62	6,47	9,24	9,67
17 _{R1}	8,12	3,71	4,16	4,64	7,52	7,74	3,41	3,78	4,13	7,60
18 _{R1}	9,33	4,40	5,88	8,37	9,05	9,47	3,83	6,12	8,49	8,85
1 _{R2}	9,53	3,77	5,14	6,30	8,72	9,30	4,36	5,17	7,34	8,72
2 _{R2}	10,95	4,10	6,82	9,91	9,53	10,85	4,53	6,97	9,30	9,12
3 _{R2}	10,53	4,72	6,68	9,27	9,76	10,59	4,55	7,08	10,05	9,62
4 _{R2}	10,11	4,16	5,78	7,20	8,72	10,24	4,15	5,76	7,74	8,53
5 _{R2}	10,39	4,43	6,80	9,01	9,92	10,37	4,52	6,96	9,87	8,97
6 _{R2}	10,85	4,77	6,73	9,97	8,10	10,67	4,34	6,56	8,39	9,10
7 _{R2}	10,14	4,00	6,31	9,11	8,91	9,89	4,28	5,92	9,16	8,99
8 _{R2}	10,51	4,04	6,53	8,22	7,86	10,61	4,50	5,45	9,02	8,44
9 _{R2}	10,30	4,20	6,65	9,97	9,16	10,14	4,46	6,79	9,95	9,16
10 _{R2}	9,32	4,21	5,97	8,11	8,34	9,25	4,05	5,74	7,89	8,41
11 _{R2}	9,23	3,70	5,33	7,65	8,74	9,25	4,03	5,64	7,89	9,03
12 _{R2}	9,45	3,99	4,91	6,54	8,36	9,46	4,01	4,88	7,19	9,00
13 _{R2}	9,78	4,71	6,86	10,68	9,78	9,86	4,77	6,63	9,37	9,98
14 _{R2}	9,12	4,52	6,43	8,71	8,18	9,43	4,59	6,13	8,75	8,44
15 _{R2}	8,91	4,03	5,37	7,45	8,83	8,77	4,23	5,67	7,41	8,55
16 _{R2}	9,31	4,11	6,17	8,57	8,65	9,36	4,20	6,34	8,62	8,61
17 _{R2}	9,12	3,81	5,80	7,63	8,42	9,11	4,14	5,65	8,53	8,75
1 _{R3}	10,24	3,63	5,87	8,31	9,28	10,48	4,69	6,24	9,00	9,27

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 29 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 500 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
2 _{R3}	10,35	4,77	5,28	9,18	9,43	10,10	4,43	5,98	7,86	9,30
3 _{R3}	9,94	4,28	6,22	8,55	9,63	10,20	4,55	6,34	8,33	9,53
4 _{R3}	10,37	4,18	6,54	9,84	9,89	10,26	4,06	6,38	8,74	8,16
5 _{R3}	9,58	3,96	6,37	8,15	8,62	9,25	4,35	5,36	7,44	8,86
6 _{R3}	10,27	4,78	5,73	8,36	9,45	10,21	3,85	5,95	8,54	8,90
7 _{R3}	9,54	4,08	5,60	7,18	8,31	9,73	4,44	5,47	7,26	9,10
8 _{R3}	9,36	3,60	6,11	7,94	9,03	9,49	3,79	5,67	7,79	8,51
9 _{R3}	10,67	4,19	6,53	10,14	10,05	10,76	4,73	6,67	9,87	10,07
10 _{R3}	10,34	4,46	6,55	9,53	9,21	10,50	4,44	9,36	6,62	9,77
11 _{R3}	10,80	4,28	6,73	9,70	10,13	10,99	4,86	6,62	10,16	9,28
12 _{R3}	10,34	4,56	7,21	10,75	9,43	10,49	4,76	7,50	10,34	9,89
13 _{R3}	9,96	3,94	6,26	9,11	9,77	9,95	4,41	6,05	8,91	10,06
14 _{R3}	9,91	4,25	6,46	9,05	8,96	9,98	4,84	6,71	9,22	9,54
15 _{R3}	9,77	4,64	5,30	8,17	8,46	9,44	4,32	5,79	7,98	8,21

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 30 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 500 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	10,49	4,35	6,24	9,78	9,82	10,89	4,45	6,63	10,45	10,53
2 _{R1}	9,80	4,31	6,12	8,49	9,45	9,49	3,93	6,11	8,15	8,93
3 _{R1}	9,13	4,06	5,41	7,13	8,26	9,02	3,81	5,34	7,26	8,17
4 _{R1}	7,43	3,76	3,80	4,47	6,58	7,25	3,50	3,74	4,72	6,32
5 _{R1}	9,07	3,95	5,50	8,15	8,45	9,14	4,05	6,13	8,09	8,23
6 _{R1}	8,73	3,93	5,68	7,62	7,71	8,74	3,97	5,55	6,16	7,76

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 30 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 500 $\mu\text{L/mL}$										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
7 _{R1}	9,35	3,84	6,73	8,90	9,38	9,15	4,34	6,09	8,56	8,72
8 _{R1}	7,79	3,45	4,43	6,32	6,98	7,88	3,78	4,71	5,90	6,68
9 _{R1}	8,68	3,91	5,45	8,17	8,34	8,57	3,96	5,79	7,29	8,32
10 _{R1}	8,85	4,22	5,49	8,92	8,59	8,69	4,08	5,33	7,40	8,57
11 _{R1}	9,22	3,87	6,49	9,23	8,50	9,22	4,41	6,52	8,80	8,55
1 _{R2}	10,51	4,36	6,17	7,93	11,38	10,19	4,38	6,22	8,85	10,69
2 _{R2}	10,05	4,35	5,64	8,90	9,67	10,04	4,32	6,05	8,66	8,94
3 _{R2}	9,29	4,34	5,82	8,25	9,09	8,77	4,21	6,04	8,26	8,87
4 _{R2}	10,35	4,52	6,11	9,43	9,34	10,47	4,17	6,28	9,98	8,58
5 _{R2}	10,15	4,26	6,10	9,03	10,33	9,99	3,76	5,66	8,95	9,71
6 _{R2}	10,73	4,13	6,93	9,62		10,78	4,10	6,05	10,84	
7 _{R2}	9,02	3,84	4,98	6,65	9,16	9,09	3,98	4,68	6,72	8,46
8 _{R2}	10,46	4,57	6,29	9,68	9,75	10,54	4,09	6,59	9,48	9,50
9 _{R2}	9,63	3,97	5,76	9,35	9,06	9,47	3,70	6,14	8,30	8,68
10 _{R2}	10,62	4,68	7,46	10,73	10,40	10,21	4,48	6,86	11,57	10,03
11 _{R2}	11,23	4,84	7,43	11,72	10,71	11,01	4,55	7,23	11,36	10,05
1 _{R3}	10,35	4,48	6,30	8,54	9,45	10,09	3,99	5,82	9,02	7,72
2 _{R3}	10,56	4,09	6,22	9,79	9,47	10,81	4,44	7,13	10,43	9,67
3 _{R3}	10,50	3,81	7,01	10,50	10,05	10,45	4,17	6,10	10,69	10,36
4 _{R3}	10,39	4,59	8,74	14,58	9,16	10,48	4,92	5,76	8,86	9,55
5 _{R3}	10,64	4,72	6,22	9,97	8,34	10,47	4,56	6,24	9,59	9,81
6 _{R3}	9,51	3,63	4,74	6,50	8,64	9,39	4,04	4,70	6,81	8,70
7 _{R3}	10,66	4,57	7,28	10,10	10,32	10,72	4,39	8,06	10,53	10,47
8 _{R3}	10,07	4,41	6,26	8,92	9,26	10,79	4,51	6,40	9,36	9,13
9 _{R3}	11,07	4,45	7,94	11,27	10,37	10,89	4,98	7,92	11,51	10,68
10 _{R3}	9,51	4,39	7,50	9,80	10,26	9,44	4,25	7,22	9,87	9,58

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 31 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 750 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	10,10	4,39	5,56	7,00	9,05	10,01	4,39	5,31	7,76	8,78
2 _{R1}	11,12	4,67	7,26	11,29	9,95	11,42	5,05	7,56	13,09	10,64
3 _{R1}	10,28	4,63	6,81	10,11	10,03	10,00	4,72	7,29	9,74	9,63
4 _{R1}	10,38	4,51	7,60	11,32	10,55	10,39	4,90	7,64	12,03	10,05
5 _{R1}	9,41	4,02	5,77	7,90	9,19	9,46	4,10	5,89	7,55	9,11
6 _{R1}	9,47	3,98	5,63	8,27	8,99	9,64	4,04	6,02	8,41	8,90
7 _{R1}	10,83	4,45	5,79	9,72	9,86	11,04	4,29	6,36	9,59	9,75
8 _{R1}	10,78	4,27	7,27	11,13	10,09	10,69	4,92	8,11	10,66	9,68
9 _{R1}	10,05	3,59	6,19	9,43	8,50	10,04	4,43	6,45	9,97	9,06
10 _{R1}	8,72	4,01	5,00	6,39	8,14	8,85	3,74	5,60	7,49	8,24
11 _{R1}	10,80	4,71	7,48	10,99	9,18	10,79		6,79	10,77	10,00
12 _{R1}	9,06	4,16	5,72	7,87	8,01	8,89	4,00	5,37	7,31	9,10
13 _{R1}	9,23	4,05	5,56	9,00	9,14	9,14	4,32	5,27	8,31	9,13
14 _{R1}	9,64	3,80	5,67	8,60	8,68	9,57	4,07	5,61	8,50	8,26
15 _{R1}	10,08	4,11	5,88	9,37	9,21	9,86	4,48	6,22	9,11	9,06
16 _{R1}	9,76		7,15		9,78	9,79		7,40		9,41
17 _{R1}	8,39	3,97	4,65	5,81	8,46	8,46	3,81	4,63	6,39	8,05
1 _{R2}	9,47	3,97	5,03	7,23	8,74	9,31	4,07	4,91	6,95	8,51
2 _{R2}	9,37	4,02	5,69	8,26	8,60	9,33	4,07	5,43	9,24	8,83
3 _{R2}	10,14		6,14	8,59	9,36	10,18		6,29	8,93	8,94
4 _{R2}	8,68	3,93	4,74	6,85	8,22	8,59	3,40	4,81	6,25	8,09
5 _{R2}	9,67	4,39	5,83	8,74	9,14	9,52	4,11	6,02	8,98	8,94
6 _{R2}	9,92	3,91	6,22	9,31	9,33	9,70	4,32	5,93	8,29	8,74
7 _{R2}	10,15	4,16	6,85	10,12	9,80	10,10	4,13	6,61	9,39	9,29
8 _{R2}	10,18	4,35	7,53	10,92	9,24	10,33	4,43	7,04	10,48	8,45
9 _{R2}	10,40	3,86	7,17	10,15	9,41	10,29	4,20	6,70	9,69	8,91
10 _{R2}	9,29		5,57	8,09	8,39	9,08		5,54	7,79	8,29
11 _{R2}	9,87	4,34	6,54	9,24	8,77	10,02	4,28	6,62	9,73	9,05

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 31 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Controle 750 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
Réplica										
12 _{R2}	9,24	4,35	4,76	6,89	9,00	9,25	4,17	4,76	6,70	9,04
13 _{R2}	10,69	4,67		10,77	9,62	10,63	4,72		9,55	8,94
14 _{R2}	9,84	4,59	5,89	9,98	9,46	9,92	4,48	5,96	8,89	9,67
15 _{R2}	7,60	3,78	4,34	4,57	7,14	7,73	3,72	4,06	6,01	7,04
1 _{R3}	9,09	4,41	5,59	7,71	9,16	8,65	4,43	5,57	8,12	9,21
2 _{R3}	10,34	4,26	6,12	9,19	8,88	10,53	5,01	5,99	9,32	9,51
3 _{R3}	10,59	4,65	7,31	11,57	9,78	10,59	4,52	7,62	10,86	9,73
4 _{R3}	9,36	4,38	5,79	8,68	8,43	9,16	4,45	6,18	9,22	8,99
5 _{R3}	9,75	4,36		9,84	8,65	10,17	5,00	6,53	9,94	8,74
6 _{R3}	9,86	4,18	7,28	10,75	9,40	9,97	4,52	6,90	10,83	9,23
7 _{R3}	10,00	4,21	6,45	9,42	8,15	9,83	4,38	6,21	10,07	8,32
8 _{R3}	10,32	4,07	5,67	9,15	9,64	10,13	4,26	6,11	9,61	8,69
9 _{R3}	10,41	4,76	7,19	10,09	9,52	10,30	4,25	6,87	10,90	9,51
10 _{R3}	9,95	4,16	6,06	9,07	9,01	9,96	4,24	6,33	8,72	8,85
11 _{R3}	8,86	3,86	4,76	6,03	7,52	8,84	3,80	4,60	5,74	7,34
12 _{R3}	8,79	3,92	5,73	7,94	8,97	8,93	4,12	5,86	7,88	8,16
13 _{R3}	9,88	4,09	6,50	9,60	8,55	9,76	4,61	5,78	9,36	8,53
14 _{R3}	10,09	4,26	6,97	10,43	9,12	10,36	4,85	7,58	10,68	9,50

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 32 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Tratado 750 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
Réplica										
1 _{R1}	11,35	4,94	7,09	12,19	10,95	11,64	5,49	7,50	12,00	11,29
2 _{R1}	9,60	4,39	5,69	9,08	8,89	9,29	3,80	5,55	8,34	9,22

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 32 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)

Tratado 750 µL/mL										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
3 _{R1}	4,24		7,19	10,27	9,27	4,57		6,64	9,66	9,38
4 _{R1}	9,88	4,30	5,85		8,78	9,88	4,17	5,79		8,67
5 _{R1}	9,72	3,98	6,21	9,80	8,80	9,78	4,68	6,53	9,95	8,33
6 _{R1}	9,45	3,93	5,60	8,67	8,98	9,40	4,19	5,88	9,25	8,81
7 _{R1}	9,97	4,09	5,18	8,28	8,98	9,77	4,02	5,76	8,45	8,53
8 _{R1}	9,69	3,84	6,70	9,43		9,88	4,42	5,97	8,99	
9 _{R1}	8,61	3,87	4,97	6,58	7,84	8,75	4,07	4,74	6,42	7,94
10 _{R1}	9,39	4,53	6,90	10,70	8,79	9,45	4,60	7,21	9,04	9,15
11 _{R1}	9,30	4,13	4,82	7,45	8,90	9,43	4,44	5,64	8,05	8,50
1 _{R2}	9,64	4,36	4,34	6,39	8,99	9,11	4,04	4,14	5,37	8,16
2 _{R2}	10,18	4,55	5,23	8,96	9,93	10,28	4,30	5,57	8,61	9,53
3 _{R2}	10,15	4,34	6,09	8,67	9,68	10,02	4,39	5,72	8,35	9,65
4 _{R2}	10,54	4,87	7,05	9,11	9,76	10,55	4,71	6,45	10,39	9,69
5 _{R2}	9,36	3,83	6,13	9,09	9,33	9,16	4,19	5,96	9,27	9,01
6 _{R2}	9,30	4,07	5,52	8,03	9,37	9,46	4,41	5,58	8,50	8,88
7 _{R2}	10,97	4,36	6,80	9,59	9,91	10,74	4,46	7,05	9,51	9,84
8 _{R2}	7,26	3,35	3,61	4,66	7,63	7,44	3,54	3,64	4,69	7,35
9 _{R2}	9,42	4,01	5,43	7,67	8,28	9,55	3,98	5,47	7,81	8,50
10 _{R2}	10,30	4,37	6,39	9,30	9,43	10,25	4,34	6,45	9,72	9,52
11 _{R2}	10,25	4,93	5,94	9,42	9,72	9,96	4,36	5,93	9,13	9,29
12 _{R2}	10,07	4,12	5,76	9,82	9,38	10,19	4,82	5,81	9,40	9,62
13 _{R2}	9,31	4,02	4,58	5,99	8,00	9,33	3,92	4,65	5,73	7,64
1 _{R3}	7,39	3,32	5,04	6,90	9,02	7,49	3,28	5,14	6,94	8,78
2 _{R3}	8,95	3,41	3,67	5,51	8,21	8,96	3,66	4,19	4,52	7,94
3 _{R3}	9,16	3,53	5,17	7,87	8,52	9,21	4,00	5,29	7,57	8,65
4 _{R3}	9,35	4,08	5,35	7,48	8,86	9,42	4,12	5,78	7,98	8,67
5 _{R3}	8,96	3,82	5,78	8,33	8,48	8,93	3,96	5,55	8,44	8,58
6 _{R3}	8,50	3,77	5,04	7,78	8,52	8,55	4,08	5,39	8,16	8,65

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 32 – Medidas (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)

Tratado 750 $\mu\text{L/mL}$										
Lado	Esquerdo (mm)					Direito (mm)				
Embrião Réplica	C	O	MS	MI	T	C	O	MS	MI	T
7 _{R3}	9,21	4,20	4,95	7,39	8,74	9,25	4,11	5,39	7,83	8,24
8 _{R3}	8,48	3,91	3,97	5,51	8,01	8,27	3,76	4,03	5,64	7,79
9 _{R3}	9,79	3,63	6,30	8,99	8,74	9,36	4,20	6,14	8,97	8,59

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 33 – Testes estatísticos das medidas (mm) dos embriões vivos entre os tratamentos, concentrações e variáveis.

Lado	Variável	Teste	t ou z	p
Esquerdo	Cabeça	t	1,7573	0,1066
	Olho	t	2,0378	0,0663
	Membro superior	t	1,1919	0,2584
	Membro inferior	t	0,7417	0,4737
	Tronco	t	0,4625	0,6527
Direito	Cabeça	t	1,9536	0,0766
	Olho	t	1,9026	0,0835
	Membro superior	t	2,0989	0,0597
	Membro inferior	t	0,7409	0,4742
	Tronco	t	0,742	0,4736

mm – milímetro; t – teste t pareado.

Tabela 34 – Subtração das médias das medidas (mm) dos embriões vivos tratados e controles segundo as diferentes concentrações e réplicas.

(continua)

Medidas (mm)											
Lado	Esquerdo						Direito				
Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Réplica	Ca	O	MS	MI	Tr	Ca	O	MS	MI	Tr
100	1	-0,17	-0,07	-0,34	-0,21	-0,22	0,04	-0,20	-0,50	0,03	-0,41
	2	-0,13	-0,15	0,01	-0,31	-0,86	-0,26	-0,03	-0,01	-0,78	-0,65
	3	-0,04	-0,05	0,14	0,28	0,41	-0,14	0,04	0,05	0,55	0,42

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco.

Tabela 34 – Subtração das médias das medidas (mm) dos embriões vivos tratados e controles segundo as diferentes concentrações e réplicas.

(conclusão)

Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Medidas (mm)										
	Lado	Esquerdo					Direito				
	Réplica	Ca	O	MS	MI	Tr	Ca	O	MS	MI	Tr
300	1	0,07	-0,13	0,05	-0,16	0,21	-0,04	0,09	0,07	0,08	0,46
	2	-0,20	-0,16	-0,23	-0,56	-0,13	-0,24	-0,18	-0,44	-0,06	-0,17
	3	-0,27	-0,16	0,13	0,19	-0,18	-0,23	-0,07	0,05	0,16	-0,11
500	1	-1,38	-0,43	-0,92	-0,89	-1,15	-1,35	-0,53	-0,85	-1,86	-1,24
	2	0,33	0,16	0,11	0,72	1,07	0,22	-0,18	0,08	0,75	0,44
	3	0,23	0,07	0,64	1,07	0,22	0,23	-0,01	0,13	1,13	0,34
750	1	-0,69	-0,01	-0,16	0,23	-0,21	-0,63	0,04	-0,21	-0,15	-0,24
	2	0,12	0,07	-0,27	-0,44	0,24	0,10	0,10	-0,19	-0,27	0,26
	3	-0,94	-0,51	-1,23	-1,94	-0,35	-0,97	-0,55	-1,08	-2,04	-0,45

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco.

Tabela 35 – Testes estatísticos das medidas (mm) dos embriões vivos entre as concentrações e variáveis.

Lado	Variável	Teste	F ou H_c	p
Esquerdo	Cabeça	KW	1,154	0,7641
	Olho	KW	1,769	0,6218
	Membro superior	ANOVA	0,7256	0,5647
	Membro inferior	ANOVA	0,8223	0,5173
	Tronco	ANOVA	0,0878	0,9647
Direito	Cabeça	KW	1,051	0,7888
	Olho	ANOVA	0,3826	0,7685
	Membro superior	KW	2,483	0,4784
	Membro inferior	KW	3,41	0,3326
	Tronco	ANOVA	0,1168	0,9477

mm – milímetro; KW – Kruskal-Wallis; ANOVA – análise de variância.

Tabela 36 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)

Controle 100 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,51	1,26	1,71	1,12	0,69
2 _{R1}	0,39	0,19	0,25	0,13	0,52
3 _{R1}	0,09	0,49	0,64	0,32	0,44
4 _{R1}	0,12	0,15	0,24	0,66	0,03
5 _{R1}	0,70	0,21	0,38	0,64	0,15
6 _{R1}	0,28	0,30	0,78	0,25	0,01
7 _{R1}	0,21	0,46	0,97	2,35	0,28
8 _{R1}	0,15	0,16	0,26	0,36	1,26
9 _{R1}	0,11	0,44	0,27	0,63	0,42
10 _{R1}	0,97	0,16	0,76	0,32	0,06
11 _{R1}	0,26	0,07	0,28	0,73	0,07
12 _{R1}	0,29	0,15	1,30	0,00	0,26
13 _{R1}	0,15	0,04	0,13	0,05	0,33
14 _{R1}	0,38	0,06	0,35	0,48	0,06
15 _{R1}	0,46	0,17	0,16	1,25	0,12
16 _{R1}	0,79	0,88	0,35	1,61	0,04
17 _{R1}	0,10	0,39	0,20	1,27	0,68
18 _{R1}	0,28	0,06	0,52	0,09	0,24
1 _{R2}	0,12	0,72	0,51	0,58	0,52
2 _{R2}	0,27	0,01	0,17	0,49	0,28
3 _{R2}	0,23	0,06	0,33	1,97	0,67
4 _{R2}	0,28	0,30	0,57	0,78	0,23
5 _{R2}	0,46	0,17	0,61	0,86	0,23
6 _{R2}	0,17	0,55	0,02	0,09	0,00
7 _{R2}	0,24	0,53	0,15	0,26	0,26
8 _{R2}	0,11	0,28	1,01	1,07	0,29

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 36 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Controle 100 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
9 _{R2}	0,47	0,44	0,03	0,99	0,24
10 _{R2}	0,16	0,63	0,51	0,37	0,54
11 _{R2}	0,16	0,34	0,48	0,37	0,84
12 _{R2}	0,38	0,12	0,35	1,14	0,15
13 _{R2}	0,11	0,25	0,29	0,69	0,65
14 _{R2}	0,73	0,21	0,10	0,42	0,47
15 _{R2}	0,07	0,36	0,25	0,15	0,42
16 _{R2}	1,22		0,60	0,13	0,60
17 _{R2}	0,02	0,10	0,21		0,51
1 _{R3}	0,26	0,26	0,46	0,41	0,42
2 _{R3}	0,01	0,57	0,66	0,23	1,90
3 _{R3}	0,18	0,15	0,25	1,08	0,03
4 _{R3}	0,05	0,33	0,76	0,28	1,00
5 _{R3}	0,04	0,24	0,49	0,55	0,85
6 _{R3}	0,13	0,58	0,18	0,24	0,80
7 _{R3}	0,20	0,17	0,41	0,69	0,92
8 _{R3}	0,31	0,44	0,09	0,54	0,60
9 _{R3}	0,32	0,74	0,20	0,08	0,04
10 _{R3}	0,28	0,31	0,13	1,02	0,95
11 _{R3}	0,31	0,54	0,37	0,28	0,27
12 _{R3}	0,44	0,04	0,21		0,23
13 _{R3}	0,40	0,88	0,20	0,01	0,53
14 _{R3}	0,73	0,87	0,10	0,27	0,31
15 _{R3}	0,45	0,46	0,23	0,57	0,10
16 _{R3}	0,15	0,23	0,49	0,45	1,74

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 37 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Tratado 100 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,04	0,16	0,04	0,64	0,73
2 _{R1}	0,00	0,62	0,76	0,38	0,24
3 _{R1}	0,63	0,27	0,86	0,10	0,15
4 _{R1}	0,64	0,17	0,09	0,36	0,35
5 _{R1}	0,44	0,06	0,94	0,69	0,37
6 _{R1}	0,69	0,11	0,37	0,68	0,13
7 _{R1}	0,54	0,37	0,03	0,83	0,17
8 _{R1}	0,57	0,08	0,14	0,43	0,21
9 _{R1}	0,57	0,10	0,86	0,16	0,09
10 _{R1}	0,16	0,08	0,59	0,88	0,77
11 _{R1}	0,11	0,32	0,23	0,24	0,45
12 _{R1}	0,51	0,00	0,48	0,56	0,18
13 _{R1}	0,74	0,14	0,79	0,37	0,68
14 _{R1}	0,34	0,33	0,20	0,48	0,70
1 _{R2}	0,06	0,10		0,27	1,56
2 _{R2}	0,19	0,42	0,79	0,66	0,91
3 _{R2}	0,07	0,29	0,54	0,53	0,89
4 _{R2}	0,02	0,04	0,16	0,44	0,09
5 _{R2}	0,25	0,12	0,13	0,80	0,65
6 _{R2}	0,04	0,45	0,09	0,29	1,16
7 _{R2}	0,61	0,51		0,22	0,10
8 _{R2}	0,35	0,65	0,04	0,50	0,12
9 _{R2}	0,08	0,28	0,37	1,24	0,73
10 _{R2}	0,24	0,34	0,82	1,09	0,07
11 _{R2}	0,02	0,43	0,89	0,42	0,35
12 _{R2}	0,18	0,26	0,58	1,09	0,82
13 _{R2}	0,09	0,32	0,08	0,42	1,36

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 37 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 100 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Tratado 100 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
14 _{R2}	0,12	0,03	0,17	0,92	0,15
15 _{R2}	0,23	0,24	0,18	0,98	0,05
16 _{R2}	0,05	0,24	0,34	0,73	0,81
1 _{R3}	0,31	0,21	0,29	0,58	0,24
2 _{R3}	0,64	0,41	0,12	0,00	0,23
3 _{R3}	0,11	0,01	0,59	0,37	1,22
4 _{R3}	0,00	0,37	1,06	0,45	0,17
5 _{R3}	0,14	0,48	0,44	0,21	0,53
6 _{R3}	0,14	0,16	0,14	0,28	0,07
7 _{R3}	0,07	0,50	0,34	0,42	0,08
8 _{R3}	0,22	0,40	0,28	0,65	0,50
9 _{R3}	0,28	0,81	0,06	2,33	0,02
10 _{R3}	0,26	0,17	0,40	0,25	0,63
11 _{R3}	0,13	0,57	0,59	0,54	0,10

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 38 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Controle 300 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,18	0,37	0,11	0,46	0,48
2 _{R1}	0,24	0,06	0,29	0,06	0,25
3 _{R1}	0,24	0,39	0,58	1,35	0,02
4 _{R1}	0,19	0,42	0,74	0,31	0,54
5 _{R1}	0,06	0,75	0,26	0,05	0,03
6 _{R1}	0,53	0,22	0,02	0,88	0,02
7 _{R1}	0,01	1,16	0,05	0,50	0,02

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 38 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)					
Controle 300 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
8 _{R1}	0,11	1,19	0,70	0,51	1,34
9 _{R1}	0,18	0,35	0,58	0,35	0,17
10 _{R1}	0,83	0,28	0,01	0,63	0,79
11 _{R1}	0,13	0,00	0,42	0,86	0,50
12 _{R1}	0,19	0,24	0,34	0,35	0,81
13 _{R1}	0,11	0,10	0,18	0,25	0,49
14 _{R1}	0,08	0,34	0,35	0,79	0,51
15 _{R1}	0,08	0,11	0,30	0,12	0,61
16 _{R1}	0,13	0,23	0,48	0,30	0,20
17 _{R1}	0,26	0,23	0,21	1,21	0,54
18 _{R1}	0,22	0,05	0,30	0,54	0,61
19 _{R1}	0,21		0,42	0,11	0,70
1 _{R2}	0,02	0,11	0,13	0,89	0,03
2 _{R2}	0,29	0,41	0,26	0,16	0,40
3 _{R2}	0,21	0,02	0,63	0,93	0,82
4 _{R2}	0,04	0,08	0,71	0,00	0,32
5 _{R2}	0,08	0,17	0,25	0,46	0,49
6 _{R2}	0,10	0,09	0,36	0,71	0,38
7 _{R2}	0,06	1,11	0,17	0,94	0,01
8 _{R2}	0,00	0,15	0,01	0,11	0,49
9 _{R2}	0,11	0,28	0,13	0,10	0,04
10 _{R2}	0,02	0,00	0,05	0,17	0,62
11 _{R2}	0,02	0,26	0,35	0,35	0,44
12 _{R2}	0,11	0,05	0,75	0,14	0,16
13 _{R2}	0,02	0,11	0,28	0,05	0,09
14 _{R2}	0,02	0,24	0,44	0,03	0,55
15 _{R2}	0,04	0,25	0,62	1,09	0,58
16 _{R2}	0,06	0,47	0,08	3,95	0,89

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 38 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Controle 300 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R3}	0,21	0,00	0,34	1,01	0,21
2 _{R3}	0,13	0,56	0,47	0,29	0,31
3 _{R3}	0,11	0,11	0,80	0,31	0,02
4 _{R3}	0,13	0,55	0,79	0,14	0,99
5 _{R3}	0,25	0,15	0,14	1,24	0,06
6 _{R3}	0,37	0,03	0,09	1,63	0,91
7 _{R3}	0,25	0,16	0,13	0,36	0,35
8 _{R3}	0,15	0,33	0,03	0,51	0,79
9 _{R3}	0,12	0,11	0,09	0,05	0,35
10 _{R3}	0,67	0,09	0,25	0,18	0,02
11 _{R3}	0,67	0,62	0,19	0,18	0,11
12 _{R3}	0,04	0,56	0,15	1,43	0,20
13 _{R3}	0,32	0,27	0,11	1,02	0,30
14 _{R3}	0,46	0,00	0,36	0,01	0,80
15 _{R3}	0,03	0,03	0,50	0,86	1,45
16 _{R3}	0,21	0,66	0,65	1,02	0,27
17 _{R3}	0,04	0,56	0,83	0,50	0,03
18 _{R3}	0,88	0,12	0,72	0,33	0,30
19 _{R3}	0,39	0,75	0,73	1,77	0,44
20 _{R3}	0,22	0,07	0,41	0,73	0,09

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho;
MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 39 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Tratado 300 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,01	0,32	0,20	0,06	0,25
2 _{R1}	0,18	0,13	0,29	0,76	0,24

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho;
MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 39 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

Embrião	(continuação)				
	Tratado 300 µL/mL				
	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
3 _{R1}	0,14	0,50	0,51	0,98	0,71
4 _{R1}	0,21	0,11	0,36	0,20	0,30
5 _{R1}	0,07	0,14	0,12	1,55	0,21
6 _{R1}	0,03	0,03	0,30	0,12	0,05
7 _{R1}	0,12	0,24	0,52	1,12	0,99
8 _{R1}	0,05	0,32	0,21	0,57	0,12
9 _{R1}	0,08	0,07	0,33	0,37	0,75
10 _{R1}	0,18	0,44	0,33	0,18	1,03
11 _{R1}	0,38	1,02	0,16	0,65	0,47
12 _{R1}	0,36	0,38	0,56	0,13	0,39
1 _{R2}	0,16	0,23	0,11	0,56	0,31
2 _{R2}	0,17	0,41	0,04	1,10	0,54
3 _{R2}	0,15	0,14	0,04	0,08	0,07
4 _{R2}	0,26	0,35	0,31	0,58	0,84
5 _{R2}	0,15	0,09	0,05	0,20	0,24
6 _{R2}	0,10	0,07	0,80	0,39	0,10
7 _{R2}	0,11	0,17	0,28	0,25	0,55
8 _{R2}	0,01	0,21	0,66	0,10	0,72
9 _{R2}	0,16	0,37	0,09	0,24	0,24
10 _{R2}	0,25	0,31	0,09	1,92	0,07
11 _{R2}	0,22	0,39	0,98	0,11	0,27
12 _{R2}	0,22	0,27	0,01	0,24	0,64
1 _{R3}	0,03	0,10	0,94	0,56	0,46
2 _{R3}	0,11	0,50	0,08	0,20	0,54
3 _{R3}	0,06	0,38	0,06	1,55	0,86
4 _{R3}	0,35		0,84	0,28	0,40
5 _{R3}	0,23	0,30	0,08	1,51	0,80
6 _{R3}	0,02	0,52	0,26	0,35	0,43

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 39 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 300 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Tratado 300 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
7 _{R3}	0,34	0,14	0,06	1,27	0,44
8 _{R3}	0,13	0,20	0,29	0,19	0,30
9 _{R3}	0,21	0,56	0,30	1,71	0,36
10 _{R3}	0,32	0,84	0,54	0,36	0,65
11 _{R3}	0,07	0,04	0,41	0,33	0,54
12 _{R3}	0,11	0,61	0,37	0,17	0,58
13 _{R3}	0,33	0,26	0,21	0,28	1,20
14 _{R3}	0,18	0,21	0,29	0,95	0,20

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 40 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Controle 500 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,21	0,38	0,41	0,91	0,92
2 _{R1}	0,08	0,47	0,31	1,01	0,40
3 _{R1}	0,07	0,28	0,28	0,67	0,41
4 _{R1}	0,10	0,05	0,61	0,89	0,44
5 _{R1}	0,11	0,30	0,29	1,37	0,35
6 _{R1}	0,21	0,05	0,15	3,34	1,82
7 _{R1}	0,29	0,47	0,56	1,17	0,35
8 _{R1}	0,17	0,29	0,99	0,79	2,30
9 _{R1}	0,33	0,02	0,11	0,09	0,36
10 _{R1}	0,21	0,26	0,26	0,33	0,09
11 _{R1}	0,01	0,06	0,32	0,26	0,17
12 _{R1}	0,04	0,42	0,54	0,01	0,67
13 _{R1}	0,55	0,14	0,80	2,38	0,88

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 40 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)					
Controle 500 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
14 _{R1}	0,24	0,62	1,05	0,83	0,49
15 _{R1}	0,09	0,24	0,19	0,22	0,55
16 _{R1}	0,20	0,20	0,24	0,30	0,29
17 _{R1}	0,38	0,30	0,38	0,51	0,08
18 _{R1}	0,14	0,57	0,24	0,12	0,20
1 _{R2}	0,23	0,59	0,03	1,04	0,00
2 _{R2}	0,10	0,43	0,15	0,61	0,41
3 _{R2}	0,06	0,17	0,40	0,78	0,14
4 _{R2}	0,13	0,01	0,02	0,54	0,19
5 _{R2}	0,02	0,09	0,16	0,86	0,95
6 _{R2}	0,18	0,43	0,17	1,58	1,00
7 _{R2}	0,25	0,28	0,39	0,05	0,08
8 _{R2}	0,10	0,46	1,08	0,80	0,58
9 _{R2}	0,16	0,26	0,14	0,02	0,00
10 _{R2}	0,07	0,16	0,23	0,22	0,07
11 _{R2}	0,02	0,33	0,31	0,24	0,29
12 _{R2}	0,01	0,02	0,03	0,65	0,64
13 _{R2}	0,08	0,06	0,23	1,31	0,20
14 _{R2}	0,31	0,07	0,30	0,04	0,26
15 _{R2}	0,14	0,20	0,30	0,04	0,28
16 _{R2}	0,05	0,09	0,17	0,05	0,04
17 _{R2}	0,01	0,33	0,15	0,90	0,33
1 _{R3}	0,24	1,06	0,37	0,69	0,01
2 _{R3}	0,25	0,34	0,70	1,32	0,13
3 _{R3}	0,26	0,27	0,12	0,22	0,10
4 _{R3}	0,11	0,12	0,16	1,10	1,73
5 _{R3}	0,33	0,39	1,01	0,71	0,24
6 _{R3}	0,06	0,93	0,22	0,18	0,55

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 40 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Controle 500 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
7 _{R3}	0,19	0,36	0,13	0,08	0,79
8 _{R3}	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52
9 _{R3}	0,09	0,54	0,14	0,27	0,02
10 _{R3}	0,16	0,02	2,81	2,91	0,56
11 _{R3}	0,19	0,58	0,11	0,46	0,85
12 _{R3}	0,15	0,20	0,29	0,41	0,46
13 _{R3}	0,01	0,47	0,21	0,20	0,29
14 _{R3}	0,07	0,59	0,25	0,17	0,58
15 _{R3}	0,33	0,32	0,49	0,19	0,25

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 41 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Tratado 500 $\mu\text{L/mL}$					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,32	0,02	0,05	0,92	0,69
2 _{R1}	0,01	0,03	0,41	0,24	0,73
3 _{R1}	0,52	0,13	0,22	0,01	0,22
4 _{R1}	0,12	0,35	0,17	0,55	0,76
5 _{R1}	0,16	0,50	0,44	0,08	0,62
6 _{R1}	0,05	0,03	0,88	1,22	
7 _{R1}	0,07	0,14	0,30	0,07	0,70
8 _{R1}	0,08	0,48	0,30	0,20	0,25
9 _{R1}	0,16	0,27	0,38	1,05	0,38
10 _{R1}	0,41	0,20	0,60	0,84	0,37
11 _{R1}	0,22	0,29	0,20	0,36	0,66
1 _{R2}	0,32	0,02	0,05	0,92	0,69

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 41 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 500 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Tratado 500 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
2 _{R2}	0,01	0,03	0,41	0,24	0,73
3 _{R2}	0,52	0,13	0,22	0,01	0,22
4 _{R2}	0,12	0,35	0,17	0,55	0,76
5 _{R2}	0,16	0,50	0,44	0,08	0,62
6 _{R2}	0,05	0,03	0,88	1,22	
7 _{R2}	0,07	0,14	0,30	0,07	0,70
8 _{R2}	0,08	0,48	0,30	0,20	0,25
9 _{R2}	0,16	0,27	0,38	1,05	0,38
10 _{R2}	0,41	0,20	0,60	0,84	0,37
11 _{R2}	0,22	0,29	0,20	0,36	0,66
1 _{R3}	0,26	0,49	0,48	0,48	1,73
2 _{R3}	0,25	0,35	0,91	0,64	0,20
3 _{R3}	0,05	0,36	0,91	0,19	0,31
4 _{R3}	0,09	0,33	2,98	5,72	0,39
5 _{R3}	0,17	0,16	0,02	0,38	1,47
6 _{R3}	0,12	0,41	0,04	0,31	0,06
7 _{R3}	0,06	0,18	0,78	0,43	0,15
8 _{R3}	0,72	0,10	0,14	0,44	0,13
9 _{R3}	0,18	0,53	0,02	0,24	0,31
10 _{R3}	0,07	0,14	0,28	0,07	0,68

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 42 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Controle 750 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,09	0,00	0,25	0,76	0,27
2 _{R1}	0,30	0,38	0,30	1,80	0,69

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 42 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(continuação)					
Controle 750 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
3 _{R1}	0,28	0,09	0,48	0,37	0,40
4 _{R1}	0,01	0,39	0,04	0,71	0,50
5 _{R1}	0,05	0,08	0,12	0,35	0,08
6 _{R1}	0,17	0,06	0,39	0,14	0,09
7 _{R1}	0,21	0,16	0,57	0,13	0,11
8 _{R1}	0,09	0,65	0,84	0,47	0,41
9 _{R1}	0,01	0,84	0,26	0,54	0,56
10 _{R1}	0,13	0,27	0,60	1,10	0,10
11 _{R1}	0,01		0,69	0,22	0,82
12 _{R1}	0,17	0,16	0,35	0,56	1,09
13 _{R1}	0,09	0,27	0,29	0,69	0,01
14 _{R1}	0,07	0,27	0,06	0,10	0,42
15 _{R1}	0,22	0,37	0,34	0,26	0,15
16 _{R1}	0,03		0,25		0,37
17 _{R1}	0,07	0,16	0,02	0,58	0,41
1 _{R2}	0,16	0,10	0,12	0,28	0,23
2 _{R2}	0,04	0,05	0,26	0,98	0,23
3 _{R2}	0,04		0,15	0,34	0,42
4 _{R2}	0,09	0,53	0,07	0,60	0,13
5 _{R2}	0,15	0,28	0,19	0,24	0,20
6 _{R2}	0,22	0,41	0,29	1,02	0,59
7 _{R2}	0,05	0,03	0,24	0,73	0,51
8 _{R2}	0,15	0,08	0,49	0,44	0,79
9 _{R2}	0,11	0,34	0,47	0,46	0,50
10 _{R2}	0,21		0,03	0,30	0,10
11 _{R2}	0,15	0,06	0,08	0,49	0,28
12 _{R2}	0,01	0,18	0,00	0,19	0,04
13 _{R2}	0,06	0,05		1,22	0,68
14 _{R2}	0,08	0,11	0,07	1,09	0,21

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 42 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, controle, réplicas 1, 2 e 3.

(conclusão)					
Controle 750 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
15 _{R2}	0,13	0,06	0,28	1,44	0,10
1 _{R3}	0,44	0,02	0,02	0,41	0,05
2 _{R3}	0,19	0,75	0,13	0,13	0,63
3 _{R3}	0,00	0,13	0,31	0,71	0,05
4 _{R3}	0,20	0,07	0,39	0,54	0,56
5 _{R3}	0,42	0,64		0,10	0,09
6 _{R3}	0,11	0,34	0,38	0,08	0,17
7 _{R3}	0,17	0,17	0,24	0,65	0,17
8 _{R3}	0,19	0,19	0,44	0,46	0,95
9 _{R3}	0,11	0,51	0,32	0,81	0,01
10 _{R3}	0,01	0,08	0,27	0,35	0,16
11 _{R3}	0,02	0,06	0,16	0,29	0,18
12 _{R3}	0,14	0,20	0,13	0,06	0,81
13 _{R3}	0,12	0,52	0,72	0,24	0,02
14 _{R3}	0,27	0,59	0,61	0,25	0,38

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 43 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 µL/mL, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

(continua)					
Tratado 750 µL/mL					
Embrião	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
1 _{R1}	0,29	0,55	0,41	0,19	0,34
2 _{R1}	0,31	0,59	0,14	0,74	0,33
3 _{R1}	0,33		0,55	0,61	0,11
4 _{R1}	0,00	0,13	0,06		0,11
5 _{R1}	0,06	0,70	0,32	0,15	0,47
6 _{R1}	0,05	0,26	0,28	0,58	0,17
7 _{R1}	0,20	0,07	0,58	0,17	0,45

mm – milímetro; µL/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 43 – Assimetria (mm) dos embriões vivos na concentração de 750 $\mu\text{L/mL}$, tratado, réplicas 1, 2 e 3.

Embrião	(conclusão)				
	Tratado 750 $\mu\text{L/mL}$				
	Assimetria (mm)				
Réplica	C	O	MS	MI	T
8 _{R1}	0,19	0,58	0,73	0,44	0,00
9 _{R1}	0,14	0,20	0,23	0,16	0,10
10 _{R1}	0,06	0,07	0,31	1,66	0,36
11 _{R1}	0,13	0,31	0,82	0,60	0,40
1 _{R2}	0,53	0,32	0,20	1,02	0,83
2 _{R2}	0,10	0,25	0,34	0,35	0,40
3 _{R2}	0,13	0,05	0,37	0,32	0,03
4 _{R2}	0,01	0,16	0,60	1,28	0,07
5 _{R2}	0,20	0,36	0,17	0,18	0,32
6 _{R2}	0,16	0,34	0,06	0,47	0,49
7 _{R2}	0,23	0,10	0,25	0,08	0,07
8 _{R2}	0,18	0,19	0,03	0,03	0,28
9 _{R2}	0,13	0,03	0,04	0,14	0,22
10 _{R2}	0,05	0,03	0,06	0,42	0,09
11 _{R2}	0,29	0,57	0,01	0,29	0,43
12 _{R2}	0,12	0,70	0,05	0,42	0,24
13 _{R2}	0,02	0,10	0,07	0,26	0,36
1 _{R3}	0,10	0,04	0,10	0,04	0,24
2 _{R3}	0,01	0,25	0,52	0,99	0,27
3 _{R3}	0,05	0,47	0,12	0,30	0,13
4 _{R3}	0,07	0,04	0,43	0,50	0,19
5 _{R3}	0,03	0,14	0,23	0,11	0,10
6 _{R3}	0,05	0,31	0,35	0,38	0,13
7 _{R3}	0,04	0,09	0,44	0,44	0,50
8 _{R3}	0,21	0,15	0,06	0,13	0,22
9 _{R3}	0,43	0,57	0,16	0,02	0,15

mm – milímetro; $\mu\text{L/mL}$ – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco; R – réplica.

Tabela 44 – Testes estatísticos das assimetrias (mm) dos embriões vivos entre os tratamentos, concentrações e variáveis.

Variável	Teste	t ou z	p
Cabeça	Wilc	0,1568	0,8753
Olho	t	1,2308	0,244
Membro superior	t	-0,0379	0,7638
Membro inferior	t	1,0311	0,3246
Tronco	t	-0,1135	0,91163

mm – milímetro; Wilc – Wilcoxon; t – teste t pareado

Tabela 45 – Subtração das médias das assimetrias (mm) dos embriões vivos segundo as diferentes concentrações e réplicas.

		Assimetrias (mm)				
Concentração (μ L/mL)	Réplica	Ca	O	MS	MI	T
100	1	0,08	-0,11	-0,07	-0,20	0,06
	2	-0,14	-0,02	0,01	0,01	0,21
	3	-0,06	-0,05	0,06	0,11	-0,32
300	1	-0,06	-0,05	-0,01	0,05	0,01
	2	0,09	0,01	-0,04	-0,15	-0,01
	3	-0,10	0,07	-0,05	0,02	0,15
500	1	0,00	-0,06	-0,07	-0,34	-0,06
	2	0,08	-0,01	0,11	-0,07	0,22
	3	0,03	-0,12	0,16	0,29	0,07
750	1	0,04	0,07	0,06	-0,02	-0,12
	2	0,06	0,07	-0,02	-0,25	-0,04
	3	-0,06	-0,08	-0,05	-0,04	-0,09

mm – milímetro; μ L/mL – microlitro/mililitro; Ca – cabeça; O – olho; MS – membro superior; MI – membro inferior; Tr – tronco.**Tabela 46** – Testes estatísticos das medidas (mm) dos embriões vivos entre as concentrações e variáveis.

Variável	Teste	t ou z	p
Cabeça	ANOVA	1,921	0,2048
Olho	ANOVA	0,3175	0,8127
Membro superior	ANOVA	4,076	0,0497
Membro inferior	ANOVA	1,199	0,3705
Tronco	ANOVA	1,368	0,3204

mm – milímetro; ANOVA – análise de variância.

Tabela 47– Dados da situação dos embriões controles nas réplica 1, 2 e 3 da LC₂₅.

Controle LC ₂₅						
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Indefinido	Infértil	Glicose (mg/dL)
1 _{R1}	59,14	X				53
2 _{R1}	42,69	X				53
3 _{R1}	49,90	X				64
4 _{R1}	52,75	X				58
5 _{R1}	56,04	X				90
6 _{R1}	50,55	X				85
1 _{R2}	42,22	X				81
2 _{R2}	54,78	X				46
3 _{R2}	54,12	X				58
4 _{R2}	60,48	X				75
5 _{R2}	50,22	X				91
6 _{R2}	56,93	X				82
1 _{R3}	48,79	X				78
2 _{R3}	55,53	X				69
3 _{R3}	57,98	X				85
4 _{R3}	47,77	X				87
5 _{R3}	49,93	X				71
6 _{R3}	55,27	X				71

LC – concentração letal; g – grama; mg/dL – miligrama/decilitro; R – réplica.

Tabela 48 – Dados da situação dos embriões tratados nas réplica 1, 2 e 3 da LC₂₅.
(continua)

Tratado LC ₂₅						
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Indefinido	Infértil	Glicose (mg/dL)
1	52,45	X				79
2	50,73	X				60
3	42,73		X			92
4	48,87	X				82
5	51,73	X				77

LC – concentração letal; g – grama; mg/dL – miligrama/decilitro; R – réplica.

Tabela 48 – Dados da situação dos embriões tratados nas réplica 1, 2 e 3 da LC₂₅.
(conclusão)

Tratado LC ₂₅						
Ovo Réplica	Peso do ovo (g)	Vivo	Morto	Indefinido	Infértil	Glicose (mg/dL)
6	47,55		X			
1	46,79				X	
2	49,11		X			
3	57,26	X				87
4	52,25	X				86
5	44,04	X				105
6	55,52	X				104
1	48,51				X	
2	48,15			X		
3	49,62	X				71
4	51,03	X				25
5	57,97			X		
6	52,23		X			

LC – concentração letal; g – grama; mg/dL – miligrama/decilitro; R – réplica.

Tabela 49 – Anormalidades nos eritrócitos dos embriões vivos controles, réplicas 1, 2 e 3 da LC₂₅.

(continua)							
Controle LC ₂₅							
Embrião Réplica	Lâmina	Anormalidades nos eritrócitos					
		MN	BN	LB	BL	BD	NT
1 _{R1}	1	0	0	58	0	29	5
	2	0	0	47	0	21	3
	3	2	2	46	0	27	5
2 _{R1}	1	2	0	18	0	10	1
	2	2	0	15	0	9	0
	3	1	1	20	0	9	1
3 _{R1}	1	1	0	15	0	14	2
	2	1	1	14	0	10	1
	3	1	0	22	0	11	0

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*; R – réplica.

Tabela 49 – Anormalidades nos eritrócitos dos embriões vivos controles, réplicas 1, 2 e 3 da LC₂₅.

(continuação)

Embrião Réplica	Lâmina	Controle LC ₂₅					
		Anormalidades nos eritrócitos					
		MN	BN	LB	BL	BD	NT
4 _{R1}	3	1	0	23	0	11	2
	1	0	0	15	0	9	4
5 _{R1}	2	2	1	20	0	7	3
	3	1	0	22	0	6	4
6 _{R1}	1	0	0	17	0	8	2
	2	0	0	19	0	6	1
	3	0	0	25	0	8	2
1 _{R2}	1	0	0	50	0	12	8
	2	2	0	61	1	18	8
	3	1	1	36	0	8	6
2 _{R2}	1	1	0	54	0	16	2
	2	1	0	52	0	16	2
3 _{R2}	1	1	0	33	1	17	8
	2	2	1	25	0	21	2
	3	0	0	16	0	15	2
4 _{R2}	1	0	1	65	0	16	8
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	53	0	8	2
5 _{R2}	1	0	0	65	0	17	2
	2	1	0	53	0	19	1
	3	0	1	57	0	15	4
6 _{R2}	1	1	0	42	0	12	0
	2	1	0	35	0	11	2
	3	1	0	56	0	5	0
1 _{R3}	1	1	1	48	0	18	1
	2	1	0	55	1	14	0
	3	1	2	54	1	13	3

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*; R – réplica.

Tabela 49 – Anormalidades nos eritrócitos dos embriões vivos controles, réplicas 1, 2 e 3 da LC₂₅.

(conclusão)							
Controle LC ₂₅							
Embrião Réplica	Lâmina	Anormalidades nos eritrócitos					
		MN	BN	LB	BL	BD	NT
2 _{R3}	1	0	1	28	0	10	0
	2	1	1	33	0	11	0
	3	0	1	31	0	11	2
3 _{R3}	1	1	1	49	0	19	2
	2	2	0	51	0	19	1
	3	1	1	59	0	14	2
4 _{R3}	1	0	1	45	0	22	1
	2	3	0	66	0	22	3
	3	1	0	46	0	16	1
5 _{R3}	1	0	0	16	0	8	0
	2	1	0	21	0	5	2
	3	3	0	18	0	7	0
6 _{R3}	1	5	1	15	0	6	1
	2	3	0	12	0	10	0

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*; R – réplica.

Tabela 50 – Anormalidades nos eritrócitos dos embriões vivos tratados, réplicas 1, 2 e 3 da LC₂₅.

(continua)							
Tratado LC ₂₅							
Embrião Réplica	Lâmina	Anormalidades nos eritrócitos					
		MN	BN	LB	BL	BD	NT
1 _{R1}	1	0	1	13	0	5	4
	2	1	0	17	0	8	1
	3	1	0	15	0	5	1
2 _{R1}	1	0	1	23	0	11	4
	2	2	0	26	0	10	0
	3	1	0	32	0	8	0

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*; R – réplica.

Tabela 50 – Anormalidades nos eritrócitos dos embriões vivos tratados, réplicas 1, 2 e 3 da LC₂₅.

(conclusão)							
Tratado LC ₂₅							
Embrião Réplica	Lâmina	Anormalidades nos eritrócitos					
		MN	BN	LB	BL	BD	NT
4 _{R1}	1	0	1	50	0	20	3
	2	5	1	52	0	22	6
	3	0	1	43	0	20	6
5 _{R1}	1	5	2	30	0	16	1
	2	4	1	31	0	9	0
	3	2	3	31	0	12	1
3 _{R2}	1	1	0	38	0	11	1
	2	0	1	35	0	16	4
	3	1	1	18	0	11	2
4 _{R2}	1	0	0	49	0	16	3
	2	2	0	64	0	14	5
	3	1	0	41	0	15	3
5 _{R2}	1	2	0	25	0	7	3
	2	0	3	28	0	14	0
	3	2	2	30	0	13	2
6 _{R2}	2	2	1	29	0	8	2
	3	3	0	25	0	11	1
3 _{R3}	1	2	0	34	0	19	3
	2	1	2	31	0	15	2
	3	1	1	28	0	14	2
4 _{R3}	1	0	2	30	0	11	4

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*; R – réplica.

Tabela 51 – Média do número das anormalidades dos eritrócitos dos embriões vivos segundo os tratamentos da réplica 1 na concentração da LC₂₅.

Anormalidades dos eritrócitos na réplica 1												
Controle							Tratado					
Lâmina	MN	BN	LB	BL	BD	NT	MN	BN	LB	BL	BD	NT
1	0,67	0,67	50,33	0,00	25,67	4,33	0,67	0,33	15,00	0,00	6,00	2,00
2	1,67	0,33	17,67	0,00	9,33	0,67	1,00	0,33	27,00	0,00	9,67	1,33
3	1,00	0,33	17,00	0,00	11,67	1,00						
4	0,33	0,00	7,67	0,00	3,67	0,67	1,67	1,00	48,33	0,00	20,67	5,00
5	1,00	0,33	19,00	0,00	7,33	3,67	3,67	2,00	30,67	0,00	12,33	0,67
6	0,00	0,00	20,33	0,00	7,33	1,67						

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*.

Tabela 52 – Média do número das anormalidades dos eritrócitos dos embriões vivos segundo os tratamentos da réplica 2 na concentração da LC₂₅.

Anormalidades dos eritrócitos na réplica 2												
Controle							Tratado					
Lâmina	MN	BN	LB	BL	BD	NT	MN	BN	LB	BL	BD	NT
1	1,00	0,33	49,00	0,33	12,67	7,33						
2	0,67	0,00	35,33	0,00	10,67	1,33						
3	1,00	0,33	24,67	0,33	17,67	4,00	0,67	0,67	30,33	0,00	12,67	2,33
4	0,00	0,50	59,00	0,00	12,00	5,00	1,00	0,00	51,33	0,00	15,00	3,67
5	0,33	0,33	58,33	0,00	17,00	2,33	1,33	1,67	27,67	0,00	11,33	1,67
6	1,00	0,00	44,33	0,00	9,33	0,67	2,50	0,50	27,00	0,00	9,50	1,50

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*.

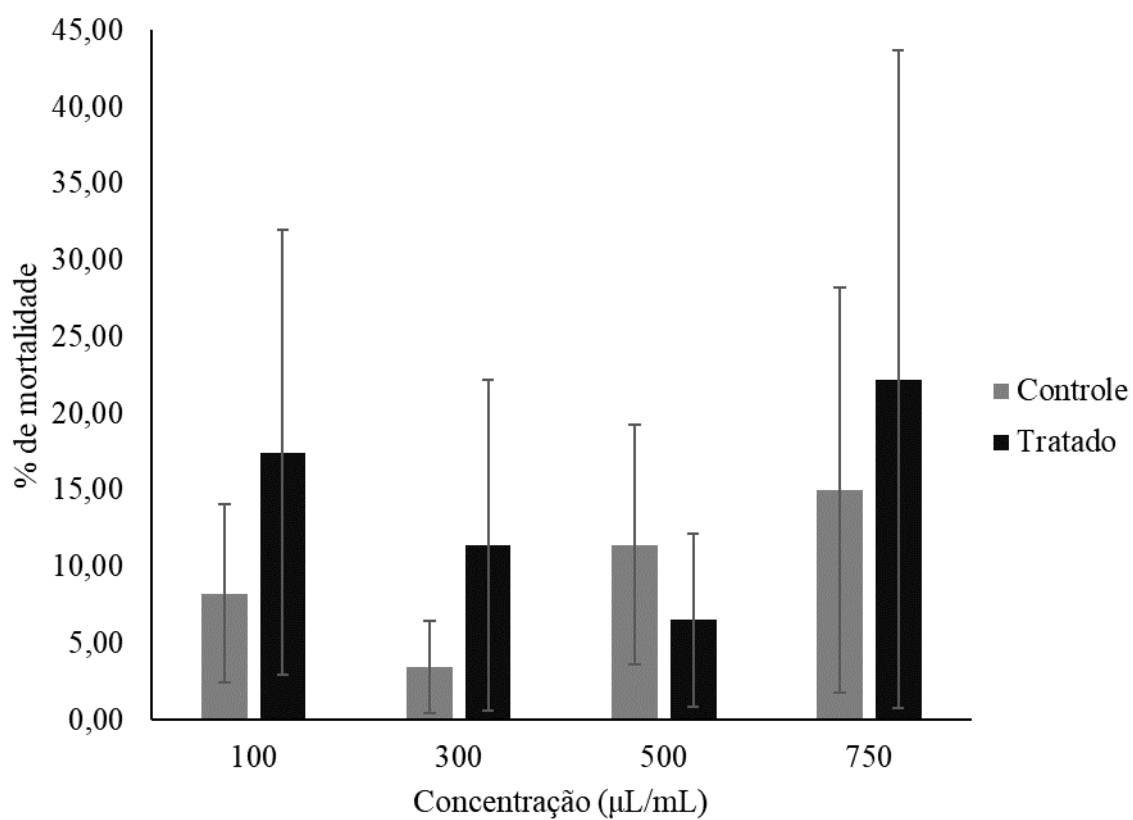
Tabela 53 – Média do número das anormalidades dos eritrócitos dos embriões vivos segundo os tratamentos da réplica 3 na concentração da LC₂₅.

Anormalidades dos eritrócitos na réplica 3												
Controle							Tratado					
Lâmina	MN	BN	LB	BL	BD	NT	MN	BN	LB	BL	BD	NT
1	1,00	1,00	52,33	0,67	15,00	1,33						
2	0,33	1,00	30,67	0,00	10,67	0,67						
3	1,33	0,67	53,00	0,00	17,33	1,67	1,33	1,00	31,00	0,00	16,00	2,33
4	1,33	0,33	52,33	0,00	20,00	1,67	0,00	2,00	30,00	0,00	11,00	4,00
5	1,33	0,00	18,33	0,00	6,67	0,67						
6	4,00	0,50	13,50	0,00	8,00	0,50						

LC – concentração letal; MN – micronúcleo; BN – binucleado; LB – lobado; BL – bilobado; BD – *bud*; NT – *notched*.

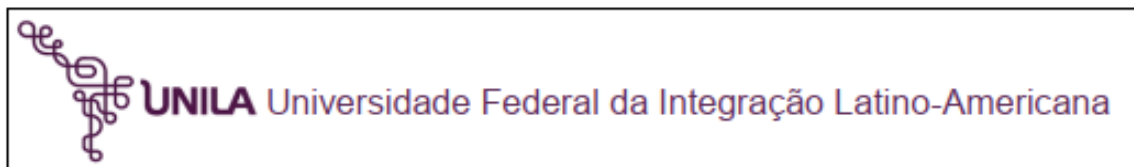
APÊNDICE B - GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual e desvio padrão dos ovos inférteis e indefinidos segundo as diferentes concentrações e tratamentos.



t pareado: $p = 0,4903$; µL/mL – microlitro/mililitro; * – diferença estatística ($p \leq 0,05$).

ANEXO A – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA

O projeto intitulado "Efeitos do fungicida Iprodiona (Rovral®) sobre o desenvolvimento de embriões de aves", processo de número 002/2018, sob responsabilidade da professora doutora Carla Vermeulen Carvalho Grade, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), sendo portanto aprovado pela CEUA desta universidade, em reunião realizada em 19 de abril do corrente ano.

Foz do Iguaçu, 21 de abril de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. Tavares", is positioned above the printed name of the coordinator.

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA