

## PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE CITOTOXICIDADE DO BIO-ÓLEO DE BABAÇU (*Attalea ssp.*)

Mariane Castardo Araujo<sup>1</sup>, Marina Moura Morales<sup>2</sup>, Eliane Papa Ambrosio Albuquerque<sup>3</sup>,  
Ana Luiza de Brito Portela Castro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Discente do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular (PBC), Universidade Estadual de Maringá.  
castardomari96@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisadora, EMBRAPA Florestas. marina.morales@embrapa.br

<sup>3</sup>Co-orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá.  
epaalbuquerque2@uem.br

<sup>4</sup>Orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá.  
albpcastro@nupelia.uem.br

### RESUMO

Protozoonoses transmitidas por carrapatos apresentam grande distribuição no território nacional e causam impactos econômicos consideráveis na bovinocultura, e o uso indiscriminado de acaricidas pode gerar resistência destes produtos. O Bio-óleo (BO) de Babaçu (*Attalea ssp.*) pode apresentar aplicabilidade como repelente de área e de contato devido as características como odor, sabor e viscosidade. A falta de estudos sobre essa aplicabilidade dos bio-óleos implica na ausência de técnicas pensadas para este produto, uma vez que é mais comum a sua aplicação como biocombustível. O objetivo deste estudo foi padronizar um teste de citotoxicidade do bio-óleo de babaçu, avaliando-se a eficácia de compostos solventes para solubilização do BO e sua citotoxicidade em vegetais, para futuras aplicações como repelente para bovinos. Nesse sentido, foram testados dois bioindicadores, baseado no crescimento radicular de cebola (*Allium cepa*) e na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) quando expostos aos solventes: etanol, Tween 80, dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol com e sem bio-óleo a 1,57%. Os resultados mostram que o uso de etanol a 97%, Tween 80 a 8% e DMSO a 50% são eficazes na diluição do BO para uso em sistemas teste, enquanto o glicerol não foi um diluente eficaz. O teste com sementes de *L. sativa* mostrou-se ineficaz para a determinação de citotoxicidade do BO em qualquer uma das soluções testadas, porém o teste em *Allium cepa* apresentou bons resultados com solução de Tween 80.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bovinocultura; Sistema *Allium cepa*; Solubilização.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, pecuaristas sofrem com perdas econômicas causadas por parasitos que interferem na saúde e bem-estar do rebanho, prejudicando a produtividade do setor. Um parasito que recebe atenção especial é o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, por causar impacto econômico capaz de gerar perdas anuais de cerca de US\$ 3,24 bilhões de dólares (GRISI *et al.*, 2014).

Uma das formas que os pecuaristas encontraram de controlar este problema foi a aplicação, frequentemente indiscriminada, de acaricidas. Esse uso indiscriminado, entretanto, tem como uma de suas consequências o desenvolvimento de resistência pelo ectoparasita às substâncias mais frequentemente utilizadas (SILVA *et al.*, 2000), tais como os piretróides (GOMES *et al.*, 2011), organofosforados (CAMPOS JÚNIOR & OLIVEIRA, 2005), associação piretróide-fosforado (FARIAS *et al.*, 2008) e amitraz (NETO & TOLEDO-PINTO, 2006).

A aplicação de repelentes que interrompem o ciclo reprodutivo do parasito, reduzindo o dano econômico causado, é uma alternativa que pode ajudar nesses casos. O seu uso em campo, entretanto, é inviabilizado pela limitação imposta pelo baixo tempo de repelência da maioria dos produtos disponíveis hoje no mercado, em que os mais eficazes só possuem ação satisfatória por cerca de 4,8 horas (SOARES *et al.*, 2010).

Os repelentes agem provocando aversão a partir dos sentidos, e são classificados conforme a ação: (I) repelentes de área, causando aversão através do odor, (II) de contato, através do sabor e (III) sistêmicos, que são absorvidos e distribuídos pelos tecidos

(NICODEMO, 2006). Repelentes de área são comumente produzidos através de óleos essenciais (OEs), misturas voláteis de compostos orgânicos de plantas (LEE & LEE, 2018), que geralmente atuam na fase de vapor, permanecendo ativo por pouco tempo (ISLAM *et al.*, 2017; GNANKINÉ & BASSOLÉ, 2017).

Outro produto que pode ter viabilidade para aplicação como repelente de área e de contato é o bio-óleo (BO), produzido a partir do processo de pirólise. É um óleo mais viscoso e menos volátil do que os OEs, imiscível em água, de forte odor, baixo pH e alta carga orgânica (BRIDGWATER, 2003; HUBER & CORMA, 2007; FAGERNAS *et al.*, 2012).

O tipo de biomassa utilizada, assim como as condições adotadas na pirólise (taxas de aquecimento e de temperatura de reação) e o tipo de pirólise (lenta, rápida, por plasma, entre outras), podem alterar as propriedades químicas do BO, (BRIDGWATER, 2003; MOHAN *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2016), podendo resultar em diferentes capacidades de repelência, assim como associar potencial risco toxicológico à saúde humana, animal ou ambiental (MUKHTAR *et al.*, 1982; SCHOKET *et al.*, 1982; SCHMID & KORTING, 1996).

Sendo utilizados os resíduos de Babaçu como matéria orgânica e o processo sendo realizado por pirólise lenta por plasma a 180°C, o BO resultante apresenta em sua composição química compostos como o fenol, creosol e benzol (ANDERSON, 1983). Em maiores quantidades ou alto tempo de exposição, esses compostos podem causar irritação, queimaduras, tonturas, dores de cabeça e inconsciência (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, c2021).

Estudos realizados pela Embrapa em parceria com a Universidade Estadual de Maringá (UEM), apontam a viabilidade do uso do BO de resíduos de Babaçu (*Attalea ssp.*) como repelente para carrapatos *Rhipicephalus B. microplus* em concentrações a partir de 1,57% (MORALES *et al.*, não publicado). Entretanto, devido às características químicas dos BOs, existe a necessidade de realizar testes de risco biológico de citotoxicidade.

Testes de citotoxicidade são frequentemente utilizados para avaliar o risco de substâncias que serão colocadas em contato com o ser humano, animais e meio-ambiente. Para isto, realizam-se análises que estudam a interferência de compostos químicos na saúde humana, animal e ambiental a partir da observação da viabilidade celular, taxa de multiplicação e uso de corantes específicos (ROGERO *et al.*, 2000a; 2000b).

O bioindicador vegetal consiste em um sistema eficiente, de baixo custo e que pode indicar possíveis efeitos em animais e em células humanas. Um deles é o teste de *Allium cepa*, rápido e de fácil manuseio (ROA *et al.*, 2012) pode ser utilizado para monitoramento ambiental e investigação de compostos que podem causar danos à saúde humana, animal e ambiental (FISKESJO, 1985). Da mesma forma, as sementes de alface (*Lactuca sativa L.*) podem ser utilizadas em bioensaios, uma vez que, após a reidratação, iniciam processo de germinação de forma a tornarem-se sensíveis ao estresse ambiental (SOUZA *et al.*, 2005).

O bio-óleo, por ser imiscível em água, tem sido diluído em etanol para ser testado como repelente. Porém, para uso em sistemas teste vegetal a água é o elemento necessário à germinação e o etanol pode ainda influenciar nos resultados. Portanto, é importante que a substância investigada seja diluída em material atóxico, que não cause viés na interpretação dos resultados.

Atualmente, não são encontrados estudos precedentes sobre o uso de BO como repelente, uma vez que o composto tem sido estudado apenas para aplicação como combustível, assim como também não há na literatura um protocolo para o teste de citotoxicidade desta substância. Desta forma, o objetivo deste estudo foi padronizar uma metodologia de análise do potencial citotóxico do Bio-óleo de Babaçu (*Attalea ssp.*), em bioindicador vegetal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os sistemas teste selecionados para avaliação da citotoxicidade em bio-óleo foram raízes de *Allium cepa* e sementes de *L. sativa*. Como solventes foram testados o etanol, Tween 80, dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, a fim de padronizar um solvente mais eficiente para ser utilizado em teste de citotoxicidade, com a finalidade de avaliar a segurança e a melhor concentração para uso como repelente de carrapatos em bovinos em testes posteriores.

## 2.1 TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

Para testar a melhor forma de solubilização do BO e definir o melhor solvente, foi testada a solubilização de BO para a concentração de 1,57%, uma vez que foi a menor concentração testada que apresentou efeito repelente contra o carrapato em teste de escalada (MORALES *et al.*, não publicado). As soluções de BO a 1,57% foram solubilizadas com: Glicerol, DMSO, Tween 80 e etanol.

Para o glicerol e o DMSO, os testes iniciaram-se em solução com 10% de solvente e essa concentração foi aumentando na ordem de 10%, até atingir a dissolução do BO a 1,57% no meio. Foi considerada como dissolução total a solução que, após 15 minutos em repouso, não formou separação de fase ou aglutinados.

O Tween 80 foi testado na concentração de 8% como recomendada por Grippa *et al.* (2010), sendo esta a maior concentração testada e considerada ausente de citotoxicidade e genotoxicidade. Da mesma forma, foi preparada a solução de BO a 1,57% em Tween 80 para o teste.

O etanol foi testado a 97%, com base em Morales *et al.* (não publicado), sendo testado também para a solubilização de BO a 1,57%.

Dessa forma, para comparação no teste de citotoxicidade, foram preparadas as soluções de BO solubilizado com cada reagente, e uma solução de cada reagente sem BO, na concentração determinada pelo teste de diluição.

## 2.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE EM *Allium cepa*

A padronização dos testes de citotoxicidade em *Allium cepa* baseou-se na metodologia descrita por Fiskesjo (1985), com algumas modificações. O teste foi realizado com sete cebolas mini gold adquiridas em estabelecimentos comerciais, sendo que uma foi utilizada para controle com água destilada e uma para cada solução preparada na etapa anterior.

Previamente aos tratamentos, cada cebola teve seu catáfilo externo removido e o bulbo levemente raspado para estimular o crescimento das raízes. As cebolas foram então incubadas por 72 h em temperatura ambiente ( $20 \pm 4^\circ\text{C}$ ) com os bulbos em contato com água destilada para observação do crescimento radicular inicial. Após, foi realizada a uniformização das raízes com lâmina, mantendo todas com 5 mm de comprimento, para então serem incubadas novamente nas soluções testes por 72 horas em temperatura ambiente.

Ao final do período de incubação, as cebolas foram retiradas das soluções e foi feita a análise qualitativa do estado geral das raízes e registro fotográfico para comparação dos resultados.

## 2.3 TESTES DE CITOTOXICIDADE EM SEMENTES DE ALFACE (*Lactuca sativa L.*)

Para o bioindicador *Lactuca sativa L.*, foram utilizadas sementes de alface peletizadas, pela facilidade de apresentar nutrientes que podem melhorar a sanidade das

plantas (SILVA *et al.*, 2002). Os testes foram adaptados a partir da metodologia de Aragão *et al.* (2015), com alterações. Para isto, sete placas de Petri 90x15mm foram forradas com disco de papel filtro embebidos com 5 mL da solução para teste, sendo uma das placas contendo água destilada (controle) e as demais, cada uma contendo as soluções testes como descrito anteriormente.

As placas receberam 30 sementes cada e foram embaladas em papel opaco, para proteger contra a luz, e incubadas por 96 h em temperatura ambiente ( $20 \pm 4^\circ\text{C}$ ). Após o período de incubação, as sementes foram contadas e fotografadas para comparação de resultados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 SOLUBILIZAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

A solução com etanol a 97% solubilizou o BO completamente, corroborando os dados de Morales *et al.* (não publicado). A solução apresentou aspecto límpido, sem turbidez, sem precipitado e sobrenadante, quando em repouso por 15 minutos.

A solubilização do bio-óleo em Tween 80 a 8% foi completa, embora formasse uma espuma quando agitada, a solução não apresentou formação de sobrenadante nem aglutinado, apresenta aspecto túrbido ao agitar.

O DMSO apresentou solubilização incompleta do BO a 50%. A solução, mesmo após agitação, ficou túrbida e com restos na parede do tubo. Entretanto, sem formação de aglutinado e sobrenadante. Apesar da solubilização estar incompleta, a solução apresentou aspecto homogêneo e a concentração de DMSO já estava muito acima daquela praticada para esse tipo de teste (SIMON *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2017; BISETTO, 2020). Sendo assim, a concentração de 50% foi a escolhida para as próximas etapas.

O glicerol não solubilizou o bio-óleo em nenhuma das concentrações testadas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90%).

Dessa forma, foram selecionadas para as próximas etapas, as soluções de Tween 80 a 8%; BO 1,57% preparado com Tween 80 a 8%; DMSO a 50%; BO 1,57% preparado com DMSO 50%; etanol 97%; e BO 1,57% preparado com etanol 97%.

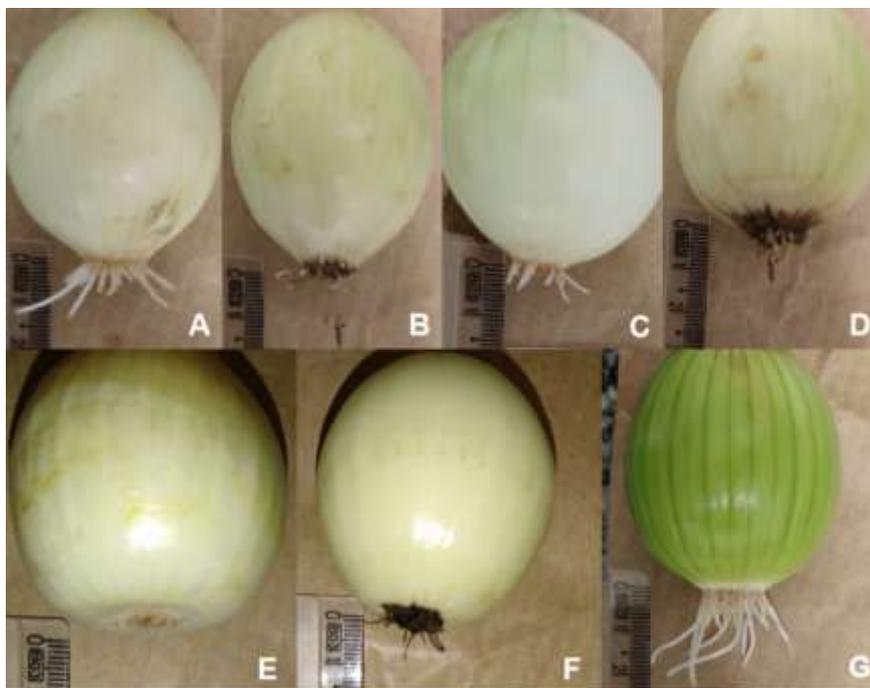
#### 3.2 CRESCIMENTO RADICULAR EM *Allium cepa*

O crescimento e estado geral das raízes após as 72 horas em tratamento com as 6 soluções e o controle (contendo água) podem ser observados na Figura 1.

A cebola tratada com solução de Tween 80 a 8% apresentou raízes com morfologia e crescimento compatíveis com o do controle negativo em água. Não observou-se danos causados ao bulbo ou região mais próxima. Não apresentou alteração na cor, formato, espessura ou rigidez das raízes. Esses resultados indicam que, assim como apontado por Grippa *et al.* (2010), o Tween 80 a 8% é um bom solvente para ser usado no teste de citotoxicidade com BO, por não ser citotóxico às raízes da cebola nesta concentração.

A cebola tratada com BO 1,57% diluído em Tween 80 apresentou crescimento reduzido em comparação com o controle negativo em água. Assim como as outras duas cebolas tratadas com BO, apresentou escurecimento das raízes e do bulbo devido à cor natural do BO. Também foi possível observar alteração na morfologia das raízes, quando comparada ao controle, as raízes ficaram tortuosas e com deformação da coifa. Esse resultado pode indicar que existe alguma interferência do BO no crescimento radicular em *Allium cepa*, quando comparado ao crescimento relativamente normal das raízes em solução de Tween 80 e no controle.

A cebola tratada com DMSO a 50% apresentou pouco crescimento radicular e raízes quebradiças, que se soltam facilmente do bulbo no manuseio. Não houve alteração na espessura e coloração destas. O pouco crescimento e a fragilidade das raízes na presença de DMSO, indica que este solvente não deve ser utilizado para teste citotóxico na concentração testada, e concentrações menores não foram capazes de solubilizar o BO.



**Figura 1:** Crescimento das raízes em teste *Allium cepa*

**Legenda:** Cebolas tratadas com as respectivas soluções após 72h. A. Tween 80 a 8%; B. BO 1,57% em Tween 80 8%; C. DMSO 50%; D. BO 1,57% em DMSO 50%; E. Etanol 97%; F. BO 1,57% em Etanol 97%; G. Controle (água).

A cebola tratada com BO 1,57% diluído em DMSO, como esperado, apresentou crescimento radicular reduzido, fragilidade das raízes, redução na espessura das raízes e deformidade da coifa. Dessa forma, o DMSO 50% não é uma opção para condução do teste de citotoxicidade em *Allium cepa*.

Como esperado, a cebola tratada com etanol 97% não apresentou bom crescimento radicular. As raízes, de tamanho reduzido, também apresentaram fragilidade, coloração quase transparente e baixa espessura. Além disso, o bulbo e a região próxima a ele apresentaram achatamento, e a região se encontrava tenra.

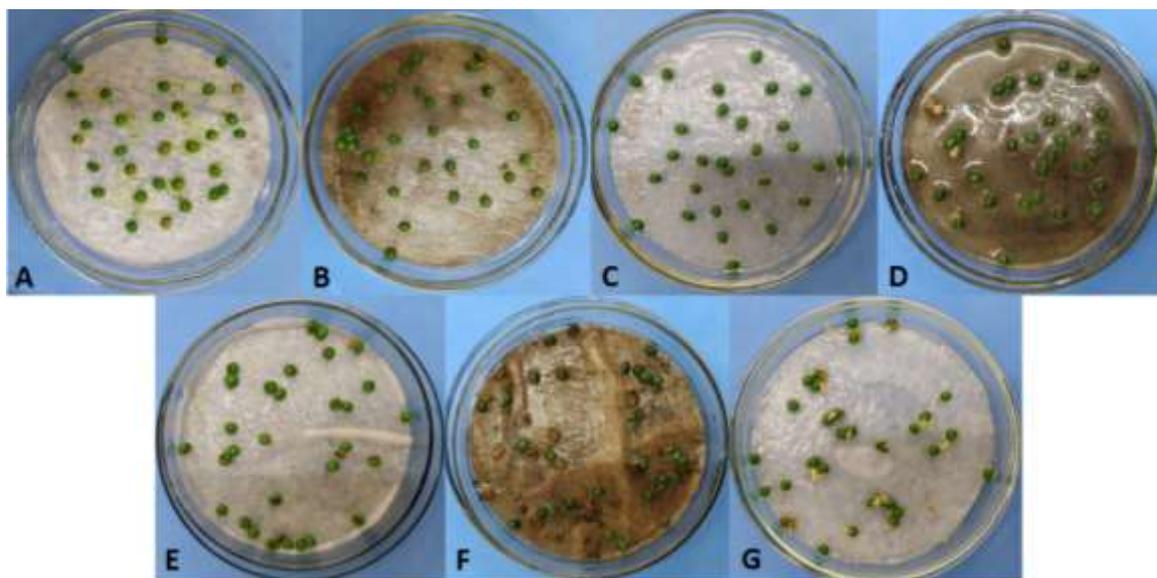
Da mesma forma, a cebola tratada com BO 1,57% diluído em etanol apresentou raízes pequenas, frágeis e afinadas, e coloração escurecida das raízes e bulbo devido ao contato com o BO. Desta forma, o etanol não deve ser usado para diluir o BO no teste de citotoxicidade em *Allium cepa*.

Os resultados obtidos servem de base para a padronização de protocolos de citotoxicidade com BO de resíduos de babaçu, porém podem ser utilizados em testes com outros óleos de composição semelhante.

### 3.3 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

As características das sementes após 96h de incubação, conforme pode ser observado na Figura 2, demonstram que apenas no grupo controle houve germinação (Fig. 2G). Dentre as 30 sementes inseridas na placa que receberam solução com água, 23

germinaram, atestando que as condições estavam propícias para a germinação. Contudo, nas outras seis placas contendo todos os tratamentos (Fig. 2A-F), não ocorreu germinação.



**Figura 1:** Germinação das sementes de *L. sativa*

**Legenda:** Sementes tratadas com as respectivas soluções após 96h. A. Tween 80 a 8%; B. BO 1,57% em Tween 80 8%; C. DMSO 50%; D. BO 1,57% em DMSO 50%; E. Etanol 97%; F. BO 1,57% em Etanol 97%; G. Controle (água).

Esses resultados sugerem que as sementes de *L. sativa* se mostraram mais sensíveis quando expostas, tanto ao BO quanto aos compostos utilizados para sua solubilização. Não há indicação, portanto, de seu uso para o teste de citotoxicidade para o bio-óleo de babaçu, com nenhum dos solventes testados, uma vez que não houve germinação das sementes em nenhuma das outras placas além daquela tratada com água.

A alta concentração de DMSO (50%) necessária para a diluição do BO pode ter sido decisiva para seus resultados tanto na germinação de sementes de alface quanto no crescimento radicular de cebolas. Outros testes realizados indicam que este composto é amplamente utilizado como solvente para análise de citotoxicidade em concentrações de 0,1 a 2%, porém concentrações acima de 25% já justificam seu uso como controle positivo por seu conhecido efeito citotóxico (SIMON *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2017; BISETTO, 2020)

Da mesma forma, embora Grisi *et al.* (2010) tenham testado Tween 80 em concentração de até 8% para teste em *Allium cepa* e não observaram efeito citotóxico, para trabalhos com sementes de *L. sativa* a concentração utilizada de Tween 80 comumente fica entre 1 a 5%, como observado em Santos *et al.* (2017) e Carvalhal *et al.* (2019), sendo que o primeiro trabalho realizou o teste com óleos essenciais. Esses dados podem indicar que uma redução na concentração do solvente viabilizaria o protocolo com sementes de alface, porém, poderia comprometer a diluição de maiores concentrações de BO.

#### 4 CONCLUSÃO

A padronização do método para a análise de citotoxicidade de bio-óleo de babaçu pode ser feita com o modelo *Allium cepa*, com BO diluído em Tween 80 a 8%. Entretanto, o teste indicou que o BO a 1,57% é citotóxico, devendo ser feito teste para a padronização com diluições menores, para indicar a concentração segura do BO para uso como repelente de carrapatos em bovinos. Adicionalmente, a citotoxicidade observada para *L. sativa* por

todos os compostos revelam a necessidade de ajustes nas concentrações dos compostos solubilizantes e do bio-óleo para realização de testes neste modelo.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, A. B. **The biology of *Orbignya martiana* (Palmae), a tropical dry forest dominant in Brazil**. 1983. Tese (Doctor in Philosophy) - University of Florida, Florida, 1983. Disponível em: <https://ufdc.ufl.edu/AA00021016/00001>. Acesso em: 17 jul. 2020.

ARAGÃO, F. B.; PALMIERI, M. J.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 1, p. 259-272, 2015. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153342221>. Acesso em: 19 nov. 2020.

BISETTO, P. **Citotoxicidade de micropartículas poliméricas mucoadesivas para liberação controlada de nistatina**. 2020. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/3170>. Acesso em: 29 jul. 2021.

BRIDGWATER, A. V. Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 91, n. 2, p. 87-102, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(02\)00142-0](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(02)00142-0). Acesso em: 18 jul. 2020.

CAMPOS JUNIOR, D. A.; OLIVEIRA, P. R. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 35, p. 1386-1392, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/3vYdr5dXHGVMGNNRCmQv6pt/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 15 jul. 2020.

CARVALHAL, V. H. B. P.; MALUF, V. H. H. K.; MOISÉS, P. S.; GUSMÃO, M. H. A.; TOLEDO, A. M. O.; GOMES, F. T. Avaliação do Potencial Alelopático do Limão Siciliano e Citronela Sobre Sementes de *Lactuca sativa* (L.). **ANALECTA**, v. 5, n. 5, 2019. Disponível em: <https://seer.cesjf.br/index.php/ANL/article/view/2384>. Acesso em: 29 jul. 2021.

FAGERNAS, L.; KUOPPALA, E.; TIILIKKALA, K.; OASMAA, A. Chemical Composition of Birch Wood Slow Pyrolysis Products. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 2, p. 1275-1283, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef2018836>. Acesso em: 17 jul. 2020.

FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1700-1704, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600032>. Acesso em: 16 jul. 2020.

FIEGE, H. Cresols and Xylenols. In: ULLMAN, F. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 7th ed. Singapore: Wiley-VCH, Weinheim, 2000. v. 10, p. 419-461. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/14356007.a08\\_025](https://doi.org/10.1002/14356007.a08_025). Acesso em: 16 jul. 2020.

FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>. Acesso em: 18 jul. 2020.

GNANKINÉ, O.; BASSOLÉ, I. L. H. N. Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against anopheles species complex giles (Diptera: Culicidae). **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28937642/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1447-1452, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000105>. Acesso em: 16 jul. 2020.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-619285>. Acesso em: 02 nov. 2020.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>. Acesso em: 16 jul. 2020.

HUBER, G. W.; CORMA, A. Synergies between bio- and oil refineries for the production of fuels from biomass. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 38, p. 7184-7201, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200604504>. Acesso em: 17 jul. 2020.

ISLAM, J.; ZAMAN, K.; DUARAH, S.; RAJU, P. S.; CHATTOPADHYAY, P. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta Tropica**, v. 167, p. 216–230, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040483/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

LEE, H.; LEE, D. G. Novel Approaches for Efficient Antifungal Drug Action. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 1771-1781, 2018. Disponível em: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201836263122232.page>. Acesso em: 16 jul. 2020.

MELO, M. R. S.; NICOLELLA, H. D.; SQUARISI, I. S.; CUNHA, N. L.; CUNHA, W. R. TAVARES, D. C. Avaliação da Citotoxicidade *In Vitro* do Triterpeno Ácido Betulínico. In: Congresso Nacional de Iniciação Científica, 17., 2017, Franca. **Anais do Conic-Semesp. SEMESP**, 2017. Disponível em: <https://www.conic-semesp.org.br/anais/files/2017/trabalho-1000025976.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2021.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef0502397>. Acesso em: 16 jul. 2020.

MORALES, M. M.; LOPES, L. B.; SILVA, B. R. RESIDUES OF *Attalea speciosa* BIO-OIL AS TICK (*Rhipicephalus B. microplus*) REPELLENT. Não publicado.

MUKHTAR, H.; LINK, C. M.; CHERNIACK, E.; KUSHNER, D. M.; BICKERS, D. R. Effect of topical application of defined constituents of coal tar on skin and liver aryl hydrocarbon hydroxylase and 7-ethoxycoumarin deethylase activities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 541-549, 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90251-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90251-4). Acesso em: 16 jul. 2020.

NETO, S. F.; TOLEDO-PINTO, E. A. Análise da eficiência de carrapaticidas contra *Boophilus microplus* em gado leiteiro. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 1-7, 2006. Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/KA7KGf2YrW8HnX\\_2013-5-27-15-35-8.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/KA7KGf2YrW8HnX_2013-5-27-15-35-8.pdf). Acesso em: 17 jul. 2020.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de repelentes na proteção de árvores dos danos provocados por herbívoros vertebrados**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15918.51529>. Acesso em: 17 jul. 2020.

PARK, L. K. E.; REN, S.; YIACOUMI, S.; YE, X. P.; BOROLE, A. P.; TSOURIS, C. Separation of Switchgrass Bio-Oil by Water/Organic Solvent Addition and pH Adjustment. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 3, 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.energyfuels.5b02537>. Acesso em: 16 jul. 2020.

ROA, O.; YEBER, M. C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 471-477, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000300009>. Acesso em: 17 jul. 2020.

ROGERO, S. O.; SOUZA-BAZZI, A.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S.; FERNANDES, K. C.; HIGA, O. Z. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 1-5, 2000a. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/bitstream/handle/123456789/7154/07145.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 jul. 2020.

ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233300000473>. Acesso em: 18 jul. 2020.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **ChemSpider**: Search and Share Chemistry. c2021. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em: 16 jun. 2021.

SANTOS, J. E. K.; SANTOS, E. N.; PETER, R.; SANTI, I.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Bioatividade do óleo essencial de Endro (*Anethum graveolens* L.) sobre o bioindicador Alface. In: Reunião Brasileira de Citogenética e Citogenômica, 5., 2017, Pelotas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 108, 2017. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/29540/22565>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SCHMID, M. H.; KORTING, H. C. Coal tar, pine tar and sulfonated shale oil preparations: Comparative activity, efficacy and safety. **Dermatology**, v. 193, n. 1, p. 1-5, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864609/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

SCHOKET, B.; HORKAY, I.; KÓSA, A.; PÁLDEÁK, L.; HEWER, A.; GROVER, P. L.; PHILLIPS, D. H. Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin in organ culture, and in mouse skin and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, n. 2, p. 241-246, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2299199/>. Acesso em: 17 jul. 2020.

SILVA, J. B. C.; SANTOS, P. E. C.; NASCIMENTO, W. M. Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/LyJmd7TjmvqSMwP9MDnPRJp/?lang=pt>. Acesso: 23 jul. 2021.

SILVA, M. C. L.; SOBRINHO, R. N.; LINHARES, G. F. C. Avaliação *in vitro* da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia, Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 143-148, 2000. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/244>. Acesso em: 16 jul. 2020.

SIMON, L.; LÓPEZ, M. L.; KRETZZMAN FILHO, N. A.; MATTE, U. Avaliação da Citotoxicidade do Tetracloreto de Carbono (CCL4) *In Vitro* nas Linhagens Hepáticas HUH7 e ARL-6. *In: Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, 33., 2013, Porto Alegre. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, nº 33, 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/119592/000905235.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 jul. 2021.

SOARES, S. F.; BRAGA, R. S.; FERREIRA, L. L.; LOULY, C.C.B.; SOUSA, L. A. D.; SILVA, A. C.; BORGES, L. M. F. Repellent activity of DEET against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs submitted to different laboratory bioassays. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 12-16, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/XFnMKrKvkHvNpv8XVvkphkjr/?lang=en>. Acesso em: 16 jul. 2020.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050101>. Acesso em: 16 jun. 2021.