

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LAURA MARIA MENDES CAMPITELLI

USO DE EMBRIÕES EM TESTES DE TOXICIDADE DE HERBICIDAS,
UMA REVISÃO ABRANGENTE.

UBERLÂNDIA

2024

LAURA MARIA MENDES CAMPITELLI

**USO DE EMBRIÕES EM TESTES DE TOXICIDADE DE HERBICIDAS,
UMA REVISÃO ABRANGENTE.**

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II)
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para a conclusão do Curso de
Graduação em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira
Co-orientador: Prof. Dr. Murilo Vieira da
Silva

UBERLÂNDIA

2024

RESUMO

O uso de embriões como modelo alternativo para avaliar a toxicidade de herbicidas, destaca-se por reduzir o uso de animais em estudos toxicológicos e se alinhar aos conceitos éticos dos 3R's. Sabe-se que a utilização de herbicidas na agricultura levanta preocupações acerca de seus riscos ambientais e de saúde pública e, com isso, os modelos embrionários de aves, anfíbios, *zebrafish* e camundongos emergem como ferramentas sensíveis e éticas para identificar os efeitos tóxicos desses compostos no desenvolvimento. Assim, o objetivo desse estudo foi revisar, qualitativamente, artigos que verificam a toxicidade de herbicidas utilizando esse modelo. A separação desses estudos foi feita por meio de bases de dados como ScienceDirect e PubMed. Dessa forma, foram selecionados artigos que testavam os princípios ativos mais utilizados na agricultura como Glifosato, 2,4-D, Atrazina, Diuron, *S-metolachlor*, *Acetochlor* e Pendimetalina. Os resultados encontrados reforçam a sensibilidade do modelo embrionário na detecção de efeitos tóxicos em baixas concentrações, se mostrando, assim, uma ferramenta eficaz para esse tipo de estudo. Portanto, apesar da falta de padronização metodológica e a heterogeneidade dos estudos limitarem a generalização, a comparação e o real entendimento do potencial tóxico das substâncias, o uso de embriões em testes de agroquímicos possui potencial para substituir os testes em animais e avançar no entendimento dos impactos de herbicidas na saúde, pois se trata de uma metodologia mais ética, replicável e que viabiliza a criação de protocolos uniformes que poderão contribuir para obtenção de mais dados sobre esse tema.

Palavras-chave: Métodos alternativos; Herbicidas; Embrião; Toxicidade

ABSTRACT

The use of embryos as an alternative model to assess herbicide toxicity stands out for its importance in reducing the use of animals in toxicological studies and in aligning with the ethical principles of the 3Rs. The use of herbicides in agriculture raises concerns about their environmental and public health risks and, therefore, embryonic models of birds, amphibians, zebrafish and mice emerge as sensitive and ethical tools to identify the toxic effects of these compounds on development. This study aimed to qualitatively review articles that explore the toxicity of herbicides using embryonic models. Searches conducted in databases such as ScienceDirect and PubMed focused on studies examining compounds including Glyphosate, 2,4-D, Atrazine, Diuron, S-metolachlor, Acetochlor, and Pendimethalin. The findings reinforce the effectiveness of embryonic models in detecting toxic effects at low concentrations, highlighting their sensitivity and utility for toxicological evaluations. However, the study also identified challenges, particularly the lack of methodological standardization and the diversity of approaches used in the analyzed studies. These limitations hinder the generalization and comparison of results, complicating a comprehensive understanding of the toxic potential of these substances. Despite these challenges, the use of embryos in agrochemical testing demonstrates potential to replace traditional animal testing. It offers a more ethical and replicable methodology, with the possibility of developing standardized protocols that could significantly contribute to a deeper understanding of herbicides' impacts on health and the environment.

Keywords: Alternative methods; Herbicide; Embryos; Toxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Herbicidas.....	8
1.2 Importância do Uso de Camundongos na Produção Científica e da Manutenção do Seu Bem-Estar.....	9
1.3 Métodos alternativos	10
1.4 Uso do Embrião na Pesquisa	11
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. METODOLOGIA	15
4.1 Pesquisa	15
4.2 Critérios de Inclusão.....	15
4.3 Critério de exclusão	15
5. RESULTADOS.....	15
5.1 Glifosato.....	15
5.2 2,4-Diclorofenoxiacético	19
5.3 Atrazina.....	22
5.4 Diuron.....	25
5.5 <i>S-metolachlor</i>.....	27
5.6 <i>Acetochlor</i>.....	29
5.7 Pendimetalina.....	32
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios do desenvolvimento de embrionário de camundongos <i>in vitro</i> ...	12
Figura 2: Estágios do desenvolvimento de embrionário de <i>zebrafish in vitro</i>	13
Figura 3: Fórmula estrutural do Glifosato.....	16
Figura 4: Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos do Glifosato	18
Figura 5: Fórmula estrutural 2,4-D.	19
Figura 6: Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos do 2,4-D.....	21
Figura 7: Fórmula estrutural Atrazina.....	22
Figura 8: Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos da Atrazina.....	24
Figura 9: Fórmula estrutural Diuron.....	25
Figura 10: Fórmula estrutural <i>S-metolachlor</i>	27
Figura 11: Fórmula estrutural <i>Acetochlor</i>	29
Figura 12: Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos do <i>Acetochlor</i>	31
Figura 13: Fórmula estrutural Pendimetalina.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Síntese da bibliografia levantada acerca do Glifosato.....	17
Tabela 2: Síntese da bibliografia levantada acerca do 2,4-D.....	19
Tabela 3: Síntese da bibliografia levantada acerca da Atrazina.....	22
Tabela 4: Síntese da bibliografia levantada acerca do Diuron.....	25
Tabela 5: Síntese da bibliografia levantada acerca do <i>S-metolachlor</i>	27
Tabela 6: Síntese da bibliografia levantada acerca do <i>Acetochlor</i>	29
Tabela 7: Síntese da bibliografia levantada acerca do Pendimetalina.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3R's	Substituição, Redução e Refinamento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOEL	Nível Aceitável de Exposição Ocupacional
CAM	Membrana corioalantóide
CEUA	Comitê De Ética Na Utilização De Animais
CL50	Concentração letal média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DRfA	Dose Referencia Aguda
g	Gramas
h	Hora
IDA	Ingestão Diária Aceitável
kg	Quilo grama
L	Litro
LD50/DL50	Dose Letal Média
m	Mili
M	Mol/Litro
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
p	Significância
ppb	Concentração em partes por bilhão
μ	Micro
UFU	Universidade Federal De Uberlândia

1-INTRODUÇÃO

1.1 Herbicidas

No Brasil, pelo Decreto n. 10.833 de 7 de outubro de 2021, é proibido o registro de agrotóxicos que apresentem evidências que são teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos, que provocam distúrbios hormonais, que provoquem danos no sistema reprodutor ou que prejudiquem o ecossistema (Brasil, 2021). Os herbicidas são uma categoria de agrotóxico utilizados para proteger plantações de plantas indesejáveis consideradas “ervas daninhas” ou pragas e estima-se que pelo menos 47,7% dos agrotóxicos utilizados no mundo pertencem a essa categoria e países como o Brasil se destacaram pela alta aplicação destes químicos em suas culturas (Pathak *et al.*, 2022; Sarıgöl Kılıç *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Dentro dos herbicidas há uma variedade de formulações químicas que recebem diferentes classificações de acordo com a sua formulação química, seletividade e momento de aplicação. Herbicidas pré-emergentes se referem a produtos que são aplicados antes do surgimento da praga, já os pós emergentes são aqueles que devem ser aplicados após o surgimento de uma planta indesejada na colheita (Correia, 2021; Marchi *et al.*, 2008b). Os seletivos podem ser aplicados nas culturas recomendadas sem prejudicar a plantação pois atuam apenas nas plantas alvos, enquanto os não seletivos, se aplicados errados, podem causar a mortalidade de todas as plantas com exceção das transgênicas tolerantes ao herbicida (Correia, 2021; Marchi *et al.*, 2008b). Por fim, os herbicidas podem se diferenciar por seu mecanismo de ação que se refere a reação bioquímica ou biofísica do herbicida na planta alvo alguns exemplos desses mecanismos são: herbicidas com Glifosato na formula atuam inibindo enzimas responsáveis pela síntese de alguns aminoácidos em plantas; os com 2,4-D provocam um crescimento desordenado dos tecidos vegetais; os com Atrazina ou Diuron inibem a peroxidação dos lipídios; se o princípio ativo for o *S-metolachlor* ou *Acetochlor* atuam inibindo a síntese de ácidos graxos de cadeia longa; e os que possuem Pendimetalina atuam inibindo a formação de microtúbulos (Correia, 2021; Marchi *et al.*, 2008b).

O uso intenso de herbicidas no Brasil vem fomentando discussões acerca da seguridade dessas substâncias pela sua persistência no ambiente e potencial de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (Marcato *et al.*, 2017). Após serem pulverizados nas plantações, os herbicidas ficam sujeitos as condições climáticas e, dessa forma, acabam contaminando e intoxicando organismos não alvo (Meng *et al.*, 2021). Para

humanos, a maior via de exposição aos herbicidas é por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados (Marcato *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022). Assim, por esses produtos estarem presentes em diversas fontes de água, sua toxicidade é testada frequentemente em animais aquáticos como anfíbios e peixes, pois eles são os primeiros a terem contato com o contaminante no ambiente e são considerados indicadores mais sensíveis de estresse ambiental (Martins *et al.*, 2021; Velki *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2021).

A forma como a toxicidade de uma substância é avaliada pode variar. No entanto, para a ANVISA, no contexto dos testes de segurança de herbicidas, os dados obtidos em experimentações *in vitro*, sem suporte de evidências *in vivo*, são considerados sugestivos, mas podem ser insuficientes para conclusões definitivas sobre o potencial tóxico de um composto (ANVISA, 2021). Assim, com base em protocolos e legislações da *European Food Safety Authority* e *United States Environmental Protection Agency*, a RDC nº 294/2019 da ANVISA estabelece os critérios para avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos. Entre esses critérios, destaca-se a exigência de testes como: Toxicidade oral aguda (DL50 oral); Toxicidade cutânea aguda (DL50 cutânea); Toxicidade inalatória aguda (CL50 inalatória); Toxicidade oral com doses repetidas por 90 (noventa) dias em ratos, camundongos e não roedores; Toxicidade crônica em ratos; Toxicidade reprodutiva por duas gerações ou estudo de Toxicidade reprodutiva de uma geração estendida, conduzidos com ratos; entre outros (ANVISA, 2019; ANVISA, 2021). De maneira geral, os testes exigidos são realizados em modelos *in vivo*. Entretanto, considerando o alto custo da utilização desse modelo, as limitações éticas de sua aplicação em larga escala e a política dos 3R's, os métodos alternativos tornam-se relevantes nesse contexto por permitirem uma pré-triagem e fornecerem indícios sobre os possíveis efeitos tóxicos de uma substância que poderá reduzir o número de animais necessários nos testes de toxicidade.

1.2 Importância do Uso do Modelo Animal na Produção Científica e da Manutenção do Seu Bem-Estar

Fazer ciência de forma correta e responsável é essencial para assegurar que um experimento seja conduzido de maneira ética, confiável e reproduzível (Turner; Barbee, 2019). Em pesquisas que utilizam modelos animais, é fundamental avaliar a real necessidade do uso desses seres e garantir sua qualidade de vida nas etapas pré, durante e pós-produção científica. A relevância da pesquisa em animais permeia os conceitos da medicina comparativa, ou seja, utilizando desse modelo é possível inferir respostas fisiometabólicas desencadeadas por patologias e tratamentos, por meio da comparação entre as

similaridades do organismo humano e animal. No tocante a qualidade de vida desses seres, é preciso compreender que, além do respeito intrínseco que devemos ter por suas vidas, o desenvolvimento de uma pesquisa pode ser prejudicado caso os animais estejam sofrendo com qualquer estímulo estressante. Isso ocorre porque quando um animal não está bem alimentado e livre de angústia, dor, doença e desconforto, sua resposta fisiológica se altera pondo em risco a qualidade dos resultados de uma pesquisa (McCausland, 2014; Veissier *et al.*, 2012).

Ao se utilizar do modelo animal, é necessário fazer com que as necessidades deste sejam atendidas, porém é preciso também cumprir com outros requisitos como: substituir sempre que possível os testes em animais por métodos alternativos como os experimentos *in vitro*; reduzir ao mínimo de significância o número de animais; e refinar seu estudo ao máximo para que seus testes causem o menor dano e estresse nos animais. Tais requisitos são o que Russell e Burch chamam de princípio dos 3R's e são deles que se derivaram diversas legislações referentes ao uso de animais na pesquisa (Bayne; Turner, 2019; Franco, 2013; Kilsoo 2023). Dessa forma, para o exercício de uma ciência integral, o estudo com animais deve respeitar não só as normas de biossegurança visando a segurança do pesquisador e da pesquisa, como também deve rigorosamente visar o cuidado e o bem-estar do animal utilizado a fim de evitar com que este sofra desnecessariamente e prejudique a confiabilidade dos resultados dos experimentos (Turner; Barbee, 2019).

1.3 Métodos Alternativos

Apesar de existir certa dependência do uso de animais em grande parte das pesquisas científicas, estudos com base em métodos alternativos vêm ganhando destaque. Tais métodos visam reduzir o uso de animais ou refinar pesquisas com este, pois determinadas características genotóxicas, carcinogênicas, de toxicidade no desenvolvimento, entre outras podem ser testadas por métodos como os estudos *in silico*, *in vitro*, pesquisa bibliográfica, utilização de outros animais no lugar de mamíferos, entre outros (Freires *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019). Nota-se a relevância dos métodos alternativos em minimizar o sofrimento animal em exemplos como o de testes de cosméticos. Recentemente, com a aprovação da resolução nº58 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), tornou-se proibido o uso de animais nessas pesquisas por se perceber que diferentes análises poderiam ser feitas em seu lugar. Exemplo disso são os testes de sensibilização da pele que, se antes eram dependentes do modelo animal, agora são realizados por métodos *in vitro* (Adler *et al.*, 2011). No caso dos testes farmacológicos, a necessidade do uso do modelo

animal reduziu-se com o auxílio desses métodos, pois é possível utilizar diversas formas de culturas de células como método de triagem de possíveis novos medicamentos (Bauer *et al.*, 2021). Entretanto, temos que no caso de testes agroquímicos ou químicos industriais ainda é pouco explorado o uso de métodos alternativos (Prior *et al.*, 2019).

1.4 Uso do Embrião na Pesquisa

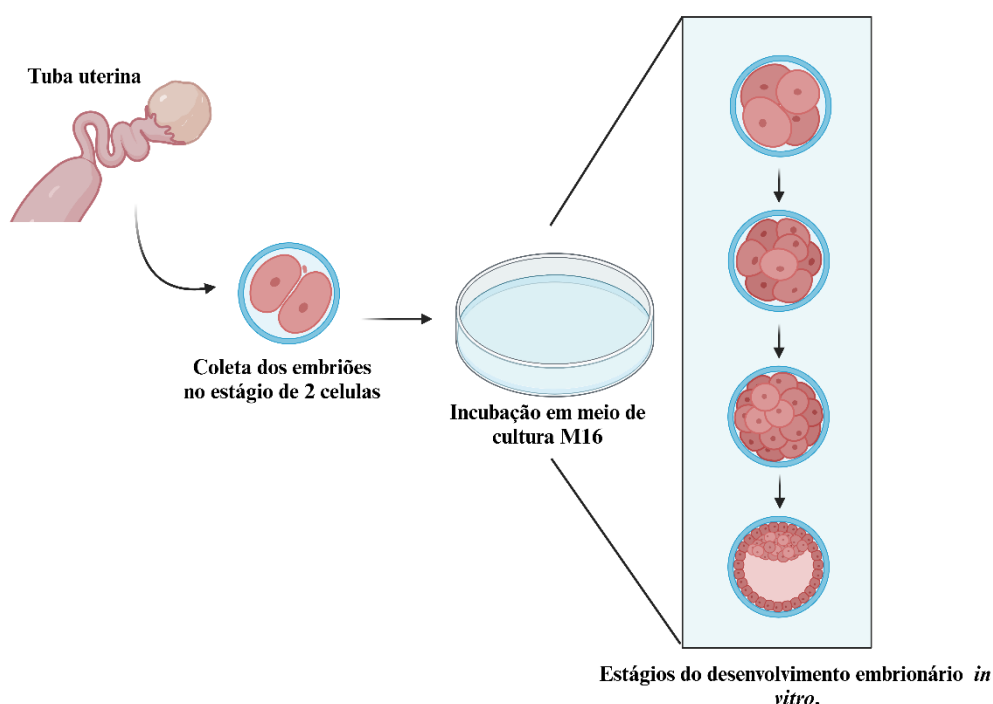
O uso de embriões na pesquisa científica tem seu início mais bem definido por volta da década de 70 e, ao longo dos anos, tal método foi cada vez mais estudado e aprimorado por se tratar de uma metodologia que visa substituir, refinar e reduzir o uso de animais de laboratório (Webster *et al.*, 1997). Pesquisas nesse modelo geralmente possuem como objetivo mais frequente observar teratogenicidade e embriotoxicidade na ausência do organismo materno, entretanto também podem explorar outros aspectos como os de mecanismos moleculares envolvidos no processo de clivagem e maturação celular (Sogorb *et al.*, 2014; Umanzor-Alvarez *et al.*, 2011). Ressalta-se que, enquanto pesquisas voltadas à análise de embriotoxicidade buscam verificar efeitos tóxicos como o de morte embrionária, crescimento retardado, e outros tipos de dano que afetam o embrião antes de ele atingir o estágio fetal. Estudos acerca de potenciais teratogênicos buscam especificamente malformações estruturais ou defeitos congênitos que ocorrem após o período de embriogênese (Sogorb *et al.*, 2014).

Em geral, as principais desvantagens da utilização de embriões na pesquisa incluem a impossibilidade de analisar a interação entre genitora e embrião visto que os testes ocorrem *in vitro* ou *in ovo*, limitação no período de embriogênese que pode ser estudado, dificuldade na observação detalhada de certas estruturas durante os estágios críticos do desenvolvimento por conta de alguns embriões estudados se desenvolverem no interior de ovos calcarinos, além de ser uma metodologia tecnicamente complexa que requer habilidades e equipamentos especializados (Horzmann *et al.*, 2018; Kurth *et al.*, 2012; Sogorb *et al.*, 2014; Webster *et al.*, 1997). Entretanto, tais características não invalidam a utilização desse modelo em pesquisas pré-clínicas. Existem diferentes modelos de embriões possíveis de serem estudados e, cada modelo, possui diferentes características que o fazem melhor a depender do objetivo da pesquisa (Webster *et al.*, 1997).

Dentro das possibilidades de modelo, os estudos com embriões de roedores são os mais utilizados e recomendados dentro desse modelo de pesquisa (Van Soom *et al.*, 2011). Eles se destacam dos demais por oferecerem praticidade, relevância biológica e compatibilidade com técnicas experimentais avançadas, seus ciclos reprodutivos rápidos o

que facilita a obtenção de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento para experimentação como mostrado na figura 1 (Sogorb *et al.*, 2014). Além disso, compartilham uma grande semelhança genética e biológica com os humanos tornando-os modelos ideais para estudos de desenvolvimento, genética e toxicologia (Posfai *et al.*, 2021). Ressalta-se, também, a existência de uma vasta quantidade de estudos acumulados ao longo dos anos com o uso de embriões de roedores o que os torna um modelo bem caracterizado com uma ampla base de referências que possibilitam a comparação de resultados (Ghimire, S. *et al.*, 2022; Sogorb *et al.*, 2014).

Figura 1 . Estágios do desenvolvimento de embrionário de camundongos *in vitro*.

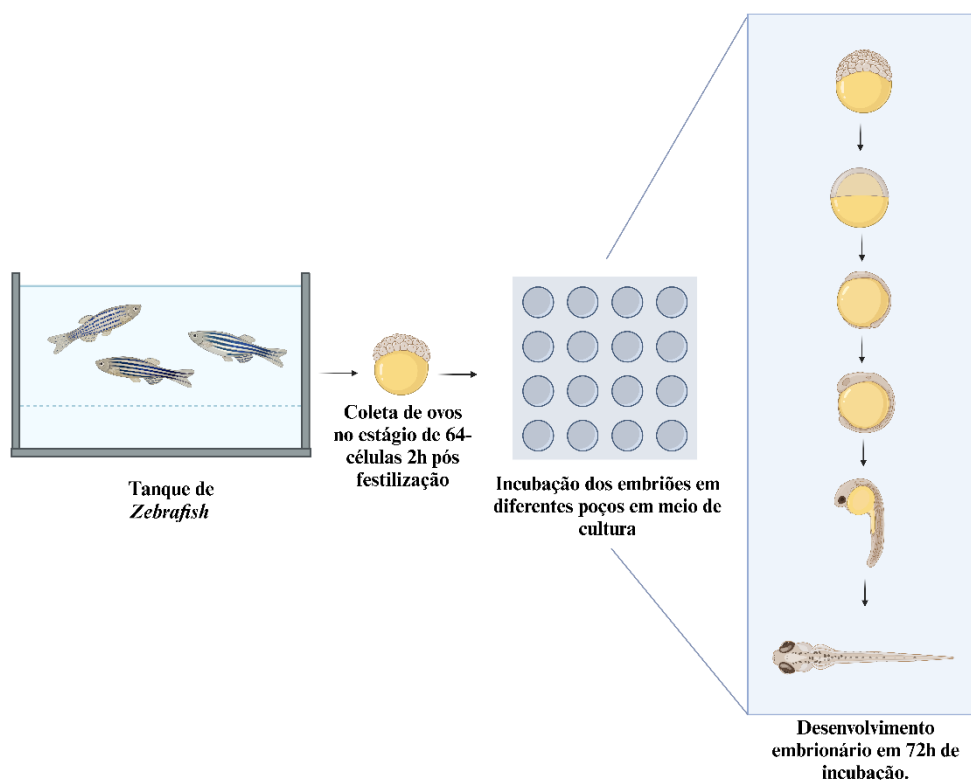


Fonte: Criado com BioRender.com pelo Autor.

Além da experimentação com estes embriões, temos também de forma bem consolidada a utilização de embriões de peixes, com destaque ao *zebrafish*, em testes de segurança química, ecotoxicológica e de toxicologia de diferentes substâncias ou nanopartículas (Johnston *et al.*, 2018). As principais vantagens desse modelo sobre os demais permeio o fato dele possui um ciclo de vida rápido, como mostrado de forma simplificada pela Figura 2, e uma alta taxa de reprodução e fecundação extracorpórea, embriões de *zabrafish* já possuem hepatócitos diferenciados após 36h a sua fecundação o que possibilita triagens rápidas de substância possivelmente hepatotóxicas (Driessen *et al.*, 2013). Além disso, o embrião do *zebrafish* é transparente o que facilita o monitoramento de processos biológicos em tempo real, como a formação de órgãos e a migração celular, sem

a necessidade de dissecação ou preparação de amostras (Driessen *et al.*, 2013; Sogorb *et al.*, 2014). Destaca-se também as características gênicas do *zebrafish*, que são amplamente conhecidas, de fácil manipulação e com 62% de seus genes ortólogos aos genes humanos (Driessen *et al.*, 2013; Perkins *et al.*, 2013).

Figura 2 . Estágios do desenvolvimento de embrionário de *zebrafish* *in vitro*.



Fonte: Criado com BioRender.com pelo Autor

A utilização de embriões de galinha é recomendada para estudos que visem observar a angiogênese e as possíveis alterações que fármacos ou substâncias tóxicas podem causar neste processo e no desenvolvimento embrionário como um todo (Ghimire, Shweta *et al.*, 2022). Este modelo se destaca em estudos que analisam vasos sanguíneos, pois são transparentes e de fácil visualização (Ghimire, Shweta *et al.*, 2022). Adicionalmente, a membrana corioalantóide (CAM) presente em embriões de galinha é frequentemente utilizada em estudos sobre crescimento tumoral e metástase, pois permite a implantação de células tumorais humanas, possibilitando a observação do crescimento e comportamento tumoral (Chu *et al.*, 2022). Este modelo também se destaca por ser mais simples e econômico que o modelo de embrião de roedor, e o ovo fornece um ambiente fisiológico controlado, de fácil manuseio e permite intervenções experimentais (Ghimire, Shweta *et al.*, 2022; Hegemann *et al.*, 2023).

Por fim, os embriões de anfíbios com destaque para as espécies *Xenopus laevis* e

Xenopus tropicalis. Eles são considerados modelos clássicos em estudos acerca da biologia do desenvolvimento, pois esses embriões são amplamente utilizados para estudar a gastrulação, a formação das camadas germinativas e a organogênese, além disso são amplamente utilizados em estudos acerca do eixo celular e de formação dos órgãos (Itoh *et al.*, 2019; Kurth *et al.*, 2012; Umanzor-Alvarez *et al.*, 2011). Em relação a testes de toxicidade ecotoxicidade, embriões desses anfíbios são mais recomendados para testes preliminares que posteriormente precisaram ser complementados com outros testes como o de em roedores (Menegola *et al.*, 2000). Com isso, é notável que os mecanismos de desenvolvimento observados em embriões de anfíbios são altamente conservados evolutivamente e aplicáveis a outros vertebrados, porém suas limitações em relação a similaridade com humanos fazem com que alguns testes nesse modelo necessitem de estudos complementares.

2 - JUSTIFICATIVA

O predomínio do uso de herbicidas na agricultura moderna tem gerado preocupações sobre seus impactos ambientais e toxicológicos, especialmente devido à ampla variedade de princípios ativos e formulações comerciais disponíveis no mercado. Assim, há a necessidade de buscar ferramentas confiáveis para a avaliação da toxicidade que combinem precisão científica, ética e viabilidade prática.

O uso de modelos experimentais alternativos, como embriões, surge como uma solução promissora para superar as limitações éticas e metodológicas associadas aos métodos tradicionais *in vivo*. Esses modelos oferecem alta sensibilidade para detectar efeitos teratogênicos, oxidativos e apoptóticos. Além disso, sua utilização está alinhada com os princípios dos 3Rs, promovendo uma abordagem mais ética na pesquisa científica.

Dessa forma, cria-se a necessidade de averiguar o atual estado da literatura acerca do uso de embriões em teste de herbicidas a fim de se explorar e validar esse modelo experimental, contribuindo para o avanço da toxicologia social e ambiental. Portanto, este trabalho justifica-se pela relevância científica e social, buscando oferecer uma coletânea acerca dos resultados mais recentes nessa área contribuindo, assim, para maior acessibilidade dos dados e estudos que se visam utilizar uma metodologia mais ética, eficaz e padronizada.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão qualitativa sobre uso de embriões em testes de toxicidade dos principais princípios ativos de Herbicidas.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Comparar os efeitos de diferentes princípios ativos de herbicidas na viabilidade e no desenvolvimento de embriões de modelos experimentais específicos;

3.2.2. Analisar os resultados toxicológicos, incluindo efeitos no crescimento, malformações e alterações moleculares, encontrados em estudos de experimentação com embriões expostos a diferentes princípios ativos de herbicidas;

3.2.3. Identificar e discutir as lacunas de conhecimento e os desafios relacionados à padronização e à aplicabilidade dos métodos utilizados em pesquisas sobre a toxicidade de herbicidas em embriões.

4 - METODOLOGIA

4.1 Pesquisa

Foram realizadas pesquisas nas plataformas Science Direct e PubMed utilizando os descritores: “*herbicide*” + “*embryo*” + “*toxicity*” + “nome do princípio ativo”, sendo que no princípio ativo foi utilizado “*Acetochlor*”, “*Pendimethalin*”, “*S-Metolachlor*”, “*Diuron*”, “*Glyphosate*”, “*Atrazine*” e “*2,4-D*”. O período considerado inclui os anos de 2000 até 2024. Além de artigos científicos, foram consultadas fontes oficiais do governo, como ANVISA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde. A partir de leitura seletiva e exploratória do material, houve análise e interpretação das evidências e sumarização dos dados;

4.2 Critérios de Inclusão

- Estudos que fizeram testes de toxicidade do princípio ativo em embriões de cordados;
- Estudos que verificaram a embriotoxicidade ou a teratogenicidade do princípio ativo *in vivo* ou *in vitro*
- Estudos de livre acesso

4.3 Critérios de Exclusão

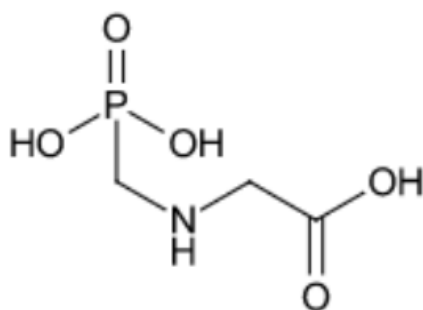
- Estudos que fizeram testes *in vitro* e não utilizaram embrião de cordado.
- Estudos de acesso pago.

5 – RESULTADOS

5.1 Glifosato

O Glifosato [*N-(phosphonomethyl)glycine*] (Figura 3) é o princípio ativo de alguns herbicidas não seletivos, sistêmicos, pós-emergentes. Ele é eficiente na eliminação de ervas daninhas monocotiledôneas e dicotiledôneas e, no Brasil, é comercializado na forma de: Glifosato-isopropilamônico, Glifosato-sal dedimetilamina, Glifosato-sal de potássio e Glifosato-sal de amônio (Agostini *et al.*, 2020). Além de ser um ingrediente ativo amplamente utilizado pelo agronegócio, o Glifosato compõe a fórmula de produtos domissanitários utilizados em jardinagem amadora. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária propôs uma reavaliação toxicológica desse composto devido a sua larga utilização no país e aos inúmeros relatos de intoxicação aguda acidental e ocupacional com elevado coeficiente de letalidade. A conclusão desse processo determinou que não existe evidências suficientes para determinar que o Glifosato é um composto com capacidade mutagênica, teratogênica ou carcinogênica e atualizou seus padrões toxicológicos para: Ingestão Diária Aceitável (IDA)= 0,5mg/kg peso corpóreo; Dose de referência Aguda (DRfA)= 0,5 mg/kg peso corpóreo; Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL)= 0,1 mg/kg peso corpóreo/dia (ANVISA, 2022).

Figura 3 . Fórmula estrutural Glifosato



Fonte: ANVISA monografia autorizada G01,2022.

Dos estudos encontrados testando essa substância, em Lehel *et al* a metodologia consistiu em expor grupos randomizados de ovos férteis de galinha a uma fórmula comercial denominada *Amega Up* (composta por de 360 g/L de Glifosato). Essa exposição foi feita por meio da injeção da substância na camara de ar dos ovos ou pela imersão do ovo no produto por 30 minutos e concluiu que, com a injeção, esse produto aumentos em 35% a mortalidade embrionária, em relação ao grupo controle, com $p < 0,05$ e aumentou em 2,7% o número de anomalias no desenvolvimento sem significância estática, já com a imersão foi possível observar que, enquanto o grupo controle apresentou 5% de mortalidade, a exposição ao produto aumentou a taxa de mortalidade para 10% e causou 2,8% de anomalias no

desenvolvimento (Lehel *et al.*, 2021). Em Paganelli *et al.*, além de ovos de galinhas, também foram feitos testes em embriões de anfíbios *Xenopus laevis* utilizando tanto o composto puro de Glifosato quanto a formulação comercial *Roundup Classic* em diferentes concentrações sendo que a exposição de ambos os embriões foram por meio da injeção dos compostos no ovo. Esse estudo utilizou diferentes marcadores moleculares, corantes e anticorpos fluorescentes para investigar a influência desses compostos no desenvolvimento e o resultado dessa experimentação mostrou que ambos os embriões apresentaram malformações craniofaciais e neurais tanto quando exposto ao composto puro, quanto a sua fórmula comercial sendo que esta última se mostrou ligeiramente mais tóxica por apresentar outros componentes em sua composição que intensificam sua penetração do Glifosato na célula (Paganelli *et al.*, 2010). No estudo de Zhang *et al.*, foram testadas diferentes concentrações de Glifosato puro e um de seus derivados metabólicos em ovos de *zebrafish*, o resultado dessa experimentação mostrou que a exposição dos embriões ao Glifosato em concentrações de 10 ng/mL, 100 ng/mL e 700ng/mL foi suficiente para provocar alterações morfofisiológicas cardíacas e, nas concentrações mais altas, também foi verificado maior intensidade de malformação e baixa taxa de eclosão dos ovos, além do aumento da taxa de apoptose nos tecidos (Zhang *et al.*, 2021). Em Dallegrave *et al.* o organismo materno foi exposto a diferentes concentrações da formulação comercial Roundup® que possui como princípio ativo o Glifosato, dessa forma, ratas Wistar foram expostas a diferentes concentrações do herbicida via gavagem oral e colocadas para acasalar com machos saudáveis. O resultado desse estudo mostra que, quando expostas a uma concentração de 1000 mg/Kg, 50% das ratas morreram entre o 7º e 14º dia da gestação, além disso a exposição em concentração de 500 mg/Kg e 700 mg/Kg causou nos fetos edemas generalizados, interrupção no desenvolvimento e alterações esqueléticas dose dependentes com percentual destas alterações sendo: grupo controle 15,4%; grupo exposto a 500 mg/Kg de herbicida 33,01%; grupo exposto a 700 mg/Kg de herbicida 42%; grupo exposto a 1000 mg/Kg de herbicida 57,3% (Dallegrave *et al.*, 2003). Semelhante a isso, Estienne *et al.* expôs galinhas a uma ração contaminada com o herbicida a base de Glifosato Gallup 360 a uma concentração de 47 mg/Kg corporal/dia, os resultados desse estudo mostram que as galinhas alimentadas com a ração contaminada tiveram a taxa de fertilidade diminuída com as porcentagens de fertilidade do grupo controle sendo 91% e a do grupo contaminado de 77% na 4ª semana de experimentação. Além disso, a mortalidade dos embriões das galinhas alimentadas com herbicida foi de 18% enquanto no grupo controle foi 5% e também foram observadas malformações craniofaciais e neuronais nos embriões das galinhas

alimentadas com ração contaminada (Estienne *et al.*,2022).

Isto posto, os dados apresentados na Tabela 1 e na Figura 4 demonstram a relação entre diferentes estudos sobre os efeitos do Glifosato no desenvolvimento embrionário, evidenciando as principais consequências observadas.

Figura 4 . Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos do Glifosato



Fonte: Criado pelo Autor

tabela 1. Síntese da bibliografia levantada acerca do Glifosato

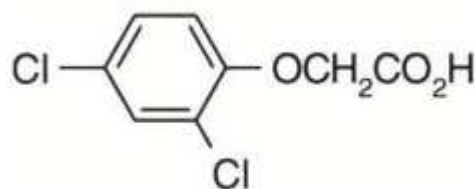
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Lehel <i>et al.</i> (2021)	Amega Up	Galinha	Injeção na câmara de ar ou imersão por 30 minutos	Injeção: 35% de mortalidade e 2,7% de anomalias Imersão: 10% de mortalidade e 2,8% de anomalias
Paganelli <i>et al.</i> (2010)	Glifosato puro e Roundup Classic	Galinha e <i>Xenopus laevis</i>	Injeção na câmara de ar e Injeção direta nas células do embrião	Malformações craniofaciais e neurais em ambos os modelos, com Roundup Classic sendo mais tóxico.
Zhang <i>et al.</i> (2021)	Glifosato puro e um de seus metabolitos	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com os tóxicos	Alterações cardíacas, maior intensidade de malformações, baixa taxa de eclosão e aumento de apoptose nas concentrações mais altas.
Dallegrave <i>et al.</i> (2003)	Roundup®	Ratas Wistar	Exposição do organismo materno por gavagem oral.	Em concentração de 1000 mg/Kg, 50% de mortalidade materna. A 500 mg/Kg e 700 mg/Kg, aumento de edemas, alterações

				esqueléticas e desenvolvimento interrompido.
Estienne <i>et al.</i> (2022)	Gallup 360	Galinha	Exposição do organismo materno a ração contaminada	Diminuição de fertilidade (77% vs 91% no controle) e aumento da mortalidade embrionária (18% vs 5% no controle), com malformações craniofaciais e neuronais.

5.2 2,4-Diclorofenoxiacético

O ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 5) é considerado o segundo princípio ativo mais comercializado no Brasil e utilizado em herbicidas de pré e pós-emergências nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. Ele atua estimulando de forma excessiva a divisão celular em plantas causando a sua morte e pode ser encontrado nas formas de: 2,4-D amina; 2,4-D Sal de Colina; 2,4-D-dimetilamina; 2,4-D-trietanolamina e 2,4-D triisopropanolamina (Marchi *et al.*, 2008a). Esse composto também passou por uma reavaliação toxicológica promovida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária que concluiu que não existem evidências suficientes para provar que o 2,4 D possui características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas relevantes, porém atualizou seus padrões toxicológicos para: Ingestão Diária Aceitável (IDA)= 0,01mg/kg peso corpóreo; Dose de referência Aguda (DRfA)= 0,75 mg/kg de peso corpóreo/dia.; Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL)= 0,01 mg/kg peso corpóreo/dia (ANVISA, 2022).

Figura 5 . Fórmula estrutural 2,4-D



Fonte: ANVISA monografia autorizada D27, 2022

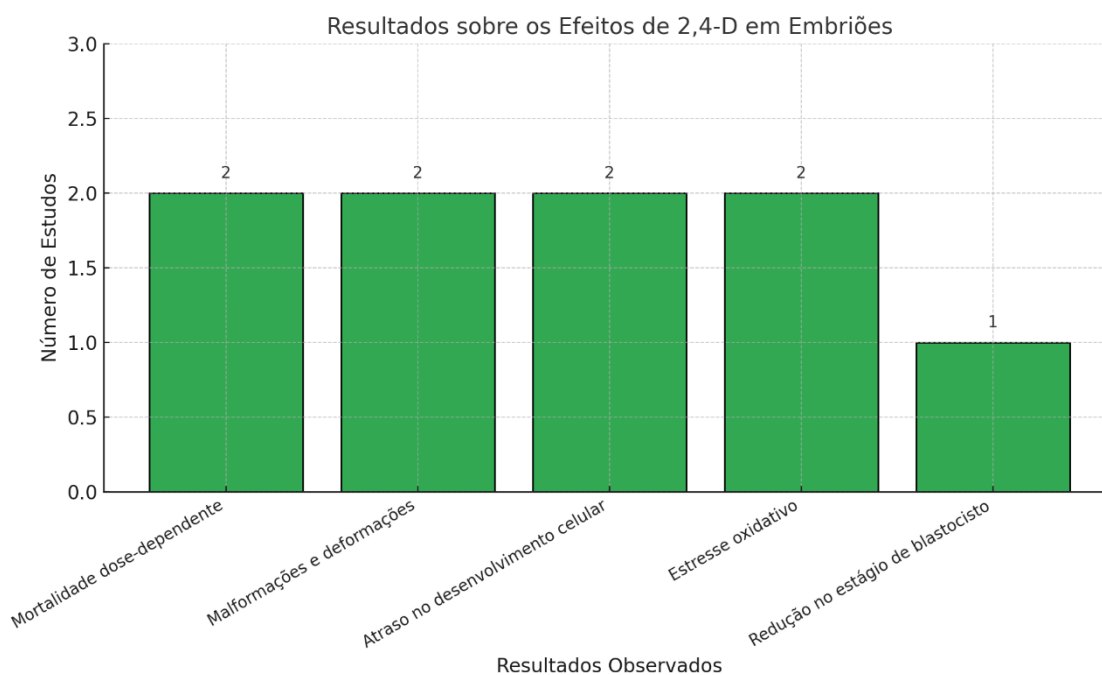
Dos estudos que exploram a toxicidade desse composto, em Martins *et al.* embriões de *zebrafish* foram expostos a concentrações de 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 40 mg/L do composto 2,4-D puro por 96h após 1h da sua concepção, dos resultados foi concluído que a taxa de mortalidade dos embriões foi dose-dependente e, nas concentrações acima de 20 mg/L, a taxa de mortalidade foi 100% após as 96h. Além disso,

em todas as concentrações foi observado atraso na eclosão, a partir da concentração 5 mg/L os embriões passaram a apresentar edemas no saco vitelino e pericárdio e em concentrações de 10 mg/L foi observado maior estresse oxidativo e danos na função hepática (Martins *et al.*, 2021). Semelhante a isso, em Li *et al.* embriões de *zebrafish* foram expostos a concentrações de 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L e 100 mg/L do composto puro de 2,4-D por 72h após 2h da sua concepção e foi concluído que todos os efeitos do composto foram dose-dependente. Com isso, a taxa de mortalidade nas concentrações de 25 mg/L e 50 mg/L variou entre 20% e 50% e atingiu 100% nas concentrações maiores ou iguais a 75 mg/mL, houve também atraso na eclosão com ela falhando por completo na concentração de 100 mg/mL, acima de 50 mg/mL foram observadas alterações cardíacas e por fim foi observado, de forma dose-dependente, a taxa de estresse oxidativo e dano ocular nos embriões (Li *et al.*, 2017). Em Viriato *et al.*, foi utilizado embriões de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) para averiguar parâmetros toxicológicos do herbicida a base de 2,4-D DMA® 806 nas concentrações de 150 mg/L, 300 mg/L, 600 mg/L, 900 mg/L e 1200 mg/L. Dos resultados, concluiu-se que para essa espécie a Concentração Letal Mediana (LC50) é 588,93 mg/L após 96 horas de exposição, a concentração para causar malformações em 50% dos embriões foi 364,65 mg/L, as malformações observadas foram edema no saco vitelino e pericárdio, curvatura anormal da coluna vertebral, redução do comprimento corporal e danos oftalmológicos (Viriato *et al.*, 2021). No estudo de Arias ovos de galinhas foram expostos ao composto puro de 2,4-D e a formulação comercial Agroxone por meio da injeção de 100 µL desses compostos na membrana interna do ovo nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 mg de produto/embrião diluídos em um solvente. Os resultados desse estudo apontam que os efeitos das substâncias nos embriões foram dose-dependentes com a formulação comercial se mostrando mais tóxica do que o composto puro, as alterações observadas foram: atraso na divisão celular dos embriões; o número total de células em divisão diminuiu significativamente; e houve um aumento significativo na frequência de trocas de cromátides-irmãs em todas as concentrações testadas de 2,4-D puro e da formulação comercial, comparado aos controles (Arias, 2003). Por fim, em Greenlee *et al.* diferentes princípios ativos puros, incluindo o 2,4-D, foram utilizados para averiguar seu potencial tóxico em embriões de camundongos CD-1, nesses testes grupos de 20 a 25 embriões foram incubados em uma cultura contendo o herbicida por 96h. Assim, os resultados desse trabalho mostram que o 2,4-D reduziu significativamente o percentual de embriões que atingiram o estágio de blastocisto, em comparação aos controles, sendo que em concentrações baixas houve uma redução moderada enquanto nas mais altas houve uma redução severa mostrando um efeito dose-dependente, além disso, um aumento no nível de

apoptose e uma redução no número total de células foi constatado mesmo nas concentrações mais baixas testadas, indicando uma sensibilidade alta dos embriões ao (Greenlee *et al.*, 2004).

Com isso, os dados apresentados na Tabela 2 e na Figura 6 demonstram a relação entre diferentes estudos sobre os efeitos do 2,4-D no desenvolvimento embrionário.

Figura 6 . Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos do 2,4-D



Fonte: Criado pelo Autor

tabela 2. Síntese da bibliografia levantada acerca do 2,4-D

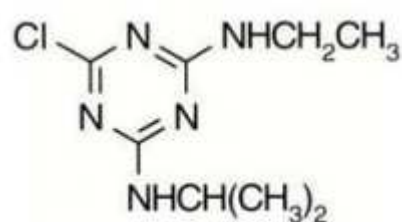
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Martins <i>et al.</i> (2021)	2,4-D puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico por 96h	Mortalidade dose-dependente atingindo 100% em 20 mg/L. Atraso na eclosão, danos e estresse oxidativo a partir de 10 mg/L.
Li <i>et al.</i> (2017)	2,4-D puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico por 72h	Mortalidade em 25 mg/L e 50 mg/L de 20% a 50% e 100% em 75 mg/mL. Efeitos dose-dependentes, estresse oxidativo e malformações.
Viriato <i>et al.</i> (2021)	DMA® 806	Rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	Meio de cultura misturado com o tóxico por 96h	Malformações nos embriões: deformações do intestino, edemas e deformação da cauda.
Arias (2003)	2,4-D puro e Agroxone	Galinha	Injeção na câmara de ar	Atraso na divisão celular, redução no número de

				células em divisão, aumento significativo nas trocas de cromátides-irmãs. A formulação comercial é mais tóxica.
Greenlee <i>et al.</i> (2004)	2,4-D puro	Camundongo CD-1	Meio de cultura misturado com o tóxico por 96h	Redução do percentual de embriões no estágio de blastocisto, aumento da apoptose e redução do número de células.

5.3 Atrazina

A Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) (Figura 7) é um princípio ativo utilizado em herbicidas seletivo pré e pós-emergências em culturas de milho, sorgo, cana-de-açúcar, café, fruteiras, cacau e pimenta-do-reino (Wirbisky-Hershberger *et al.*, 2017). Ele atua no aparelho fotossintético da planta impedindo o transporte de elétrons e aumentando o estresse oxidativo no organismo (Ho, 2020). Atualmente no Brasil esse composto é alvo do Projeto de Lei nº 5.080/2023 que tramita na câmara dos deputados e propõem a proibição do uso e comercialização de produtos com a Atrazina por existir evidências que mostram esse composto como um desregulador endócrino (BRASIL, 2023). Como o projeto está em análise, os padrões toxicológicos desse princípio no país são: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 0,1 mg/kg peso corpóreo (ANVISA, 2022).

Figura 7 . Fórmula estrutural Atrazina



Fonte: ANVISA monografia autorizada A14, 2022

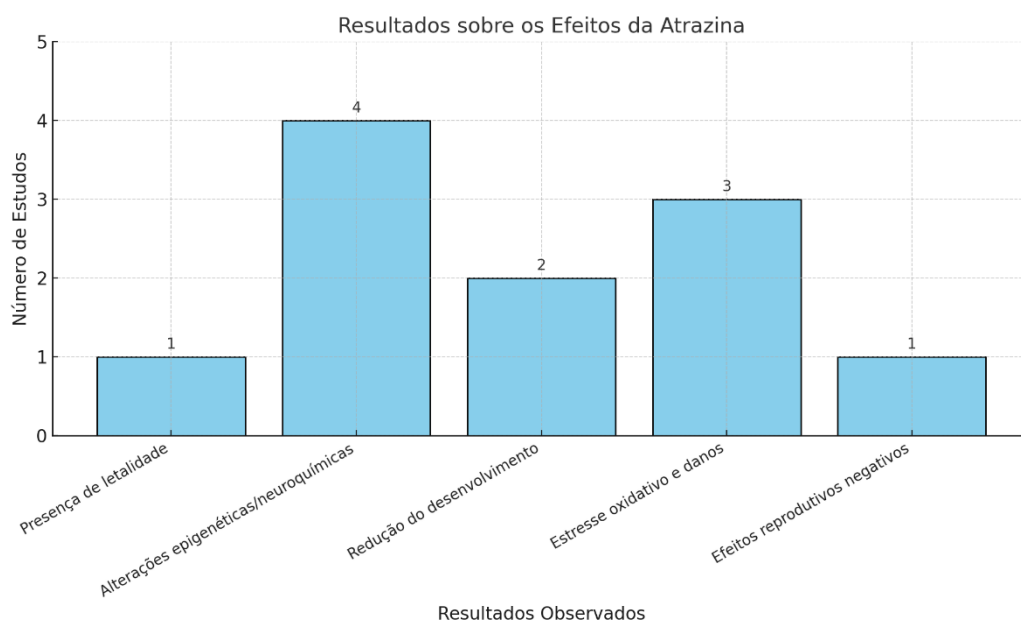
O potencial tóxico desse composto a foi explorado em diferentes estudos, em Ahkin Chin Tai *et al.* embriões de *zebrafish* no estágio de 4 a 8 células foram expostos a uma solução de Atrazina pura em placas de Petri nas concentrações 0,3 ppb, 3 ppb, 30 ppb, 300 ppb, 1.000 ppb, 3.000 ppb e 10.000 ppb por 120h. Desse estudo, os resultados mostram que em concentrações menores que 300 ppb não afetou significativamente a mortalidade dos embriões e não houve anomalias morfológicas, porém nas concentrações maiores ou iguais a 1.000 ppb houve redução moderada da sobrevivência, edemas no saco vitelino, encurtamento

do comprimento do embrião, com a maior letalidade e anomalias observada na concentração de 10.000 ppb. Já em Wirbisky-Hershberger *et al.*, embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de Atrazina nas concentrações de 0 ppb (controle), 3 ppb, e 30 ppb por 72h após a concepção. Os resultados desse estudo mostram que, apesar de nessas concentrações ter ocorrido aumento na mortalidade ou no número de malformações, houve redução de forma dose-dependente da atividade enzimática e redução de até 12% nos níveis de metilação global do DNA dos embriões, evidenciando o potencial de alteração epigenética do composto (Wirbisky-Hershberger *et al.*, 2017). Semelhante a isso, Horzmann *et al.* em 2018 e 2021 também verificou o potencial tóxico do composto puro de Atrazina em embriões de *zebrafish* nas concentrações de 0 ppb (controle), 0,3 ppb, 3 ppb e 30 ppb por 72h, os resultados corroboram para que, em baixas concentrações, não há alterações significativas em mortalidade e malformações, porém há alteração no nível de metilação com redução nos níveis de expressão dos genes relacionados a DNA metiltransferases, regulação negativa de genes envolvidos em vias de desenvolvimento neural e regulação epigenética, aumento significativo da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e aumento da expressão da enzima CYP17A1 sugerindo uma ativação das vias hormonais e desregulamentação endócrina. (Horzmann *et al.*, 2018; Horzmann *et al.*, 2021). Também, em Wirbisky *et al.* embriões de *zebrafish* foram expostos a Atrazina pura nas concentrações de 0 ppb (controle), 0,3 ppb, 3 ppb e 30 ppb por 72h e concluiu que os testes impactaram no neurodesenvolvimento do embrião que, apesar de não apresentar malformações, possuiu alterações a nível molecular e neuroquímicos (Wirbisky *et al.*, 2015). Nos estudos de Grzymkowski *et al.*, embriões do anfíbio *Xenopus laevis* foram expostos ao composto puro de Atrazina nas concentrações de 15 mg/L, 25 mg/L e 35 mg/L e isso mostrou que esse composto afeta a morfogênese intestinal, reduzindo o comprimento do intestino, alterando a rotação e desorganizando as camadas epiteliais, além de ter aumentado o estresse oxidativo e causado uma disfunção mitocondrial (Grzymkowski *et al.*, 2024). Utilizando também embriões de *Xenopus laevis*, o estudo de Lenkowski e McLaughlin expõem esses embriões ao composto puro de Atrazina na concentração de 0,035 mg/L, 0,35 mg/L, 3,5 mg/L e 35 mg/L por 6, 12, 24 e 48 horas e concluiu que nas concentrações mais altas de 3,5 mg/L e 35 mg/L o composto prejudicou a composição estrutural do embrião interrompendo a morfogênese da cartilagem crâniana e dos músculos, além de reduzir a diferenciação celular e causar alterações na estrutura do lúmen intestinal, sendo que a exposição prolongada de 48 horas aumentou esses efeitos (Lenkowski; McLaughlin, 2010). O estudo de Greenlee *et al.* também avaliou o potencial tóxico da Atrazina em embriões de camundongos CD-1, nesses testes grupos de 20 a 25 embriões foram

incubados em uma cultura contendo o herbicida na concentração de 0,035 µg/mL por 96h. Assim, os resultados desse trabalho mostram que a Atrazina aumentou significativamente o nível de apoptose dos embriões, bem como reduziu o número total médio de células e a taxa de desenvolvimento para o estágio de blastocisto para 67,06% (Greenlee *et al.*, 2004). Em Harper *et al.*, fêmeas de camundongo C57BL/6J foram expostos no 9,5 dia da gestação a composto puro de Atrazina administrado na concentração 5 mg/kg de peso corporal por dia, após o nascimento daninhada os machos foram separados e se deu continuidade na administração do composto até 12º ou a 24º semana de vida do animal. Assim, concluiu-se exposição a esse compostocausou nesses animais esteatose hepática, alterações no metabolismo lipídico, redução na qualidade e quantidade de espermatozoides e os embriões gerados por machos tratados apresentaram viabilidade reduzida e impacto na massa celular interna (Harper *et al.*, 2020).

Portanto, os dados apresentados na Tabela 3 e na Figura 8 demonstram a relação entre os diferentes estudos sobre os efeitos da Atrazina no desenvolvimento embrionário.

Figura 8 . Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos da Atrazina



Fonte: Criado pelo Autor

Tabela 3. Síntese da bibliografia levantada acerca da Atrazina.

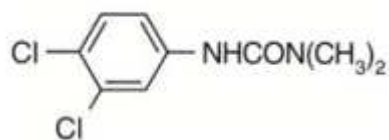
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Ahkin Chin Tai <i>et al.</i> (2021)	Atrazina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 120h	Efeitos dose-dependentes: em ≥1,000 ppb, redução da sobrevivência, edemas, encurtamento e alta letalidade em 10,000 ppb.
Wirbisky-	Atrazina	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura	Redução da atividade

Hershberger <i>et al.</i> (2017)	pura		misturado com o tóxico 72h	enzimática e níveis de metilação do DNA, sem mortalidade ou malformações.
Horzmann <i>et al.</i> (2018) e Horzmann <i>et al.</i> (2021)	Atrazina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico por 72h	Alterações epigenéticas e na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, desenvolvimento neural e regulação hormonal.
Wirbisky <i>et al.</i> (2015)	Atrazina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico por 72h	Impactos no neurodesenvolvimento molecular e neuroquímico.
Grzymkowski <i>et al.</i> (2024)	Atrazina pura	<i>Xenopus laevis</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico	Redução do comprimento intestinal, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial.
Lenkowski and McLaughlin (2010)	Atrazina pura	<i>Xenopus laevis</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 6h, 12h, 24h e 48h	Prejuízo à morfogênese craniana, muscular e intestinal em concentrações mais altas, piorando com exposição prolongada.
Greenlee <i>et al.</i> (2004)	Atrazina pura	Camundongo CD-1	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	Aumento significativo de apoptose e redução na taxa de desenvolvimento para o estágio de blastocisto.
Harper <i>et al.</i> (2020)	Atrazina pura	Fêmeas de camundongo C57BL/6J e machos da ninhada	Ingestão de água contaminada após 9,5 dias de gestação	Esteatose hepática, redução na qualidade do esperma e viabilidade dos embriões gerados por machos tratados.

5.4 Diuron

O Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] (Figura 9) é o princípio ativo de alguns herbicidas seletivo pré e pós-emergências para controlar ervas daninhas anuais e perenes de folhas largas, gramíneas e musgos (Kao *et al.*, 2019). Ele é utilizado, principalmente em culturas de milho, abacaxi, uva, soja, palma forrageira, algodão, banana, entre outras e seu mecanismo de ação se dá no bloqueio da transferência de elétrons no processo da fotossíntese, prejudicando assim esse processo nas plantas alvo. (Velki *et al.*, 2017). O uso e a comercialização desse produto são permitidos em todo território nacional e possui os padrões toxicológicos de: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,007 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 0,016 mg/kg peso corpóreo (ANVISA, 2022).

Figura 9. Fórmula estrutural Diuron



Fonte: ANVISA monografia autorizada D25, 2022

Dos estudos encontrados com esse composto, em Kao *et al.* embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de Diuron nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL por 24h e 48h e, dos resultados obtidos, não foram observadas reduções significativas na taxa de sobrevivência em ambas concentrações após 48 horas de exposição, porém, na concentração mais alta, 30% dos embriões apresentaram malformação de coluna e 20%, edema no pericárdio, na concentração de 12,5 µg/mL uma quantidade menor de embriões apresentaram malformações e totalizaram 10% desse grupo, além disso ambas concentrações estimularam o aumento dose-dependente do estresse oxidativo (Kao *et al.*, 2019). Em Velki *et al.*, embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de Diuron nas concentrações 1 mg/L, 2 mg/L e 3,8 mg/L por 96h. Os resultados desse estudo mostram que, após decorrido o tempo, a taxa de mortalidade dos embriões foi dose-dependente sendo que na concentração de 1 mg/L a taxa foi de 5%, em 2 mg/L foi de 15% e em 3,8 mg/L a taxa foi de 30%, além disso, embriões tratados com o Diuron exibiram redução na natação em resposta à transição luz-escuro, nas concentrações mais altas foi verificado edema no pericardio nas porcentagens de 10% e 25% respectivamente, também foi visto que houve redução nos batimentos cardíacos do embrião e, por fim, os embriões afetados exibiram menor atividade locomotora e maior preferência por zonas periféricas, sugerindo impactos no sistema nervoso central (Velki *et al.*, 2017).

Assim, os dados apresentados na Tabela 4 demonstra a relação entre os diferentes estudos sobre os efeitos do Diuron no desenvolvimento embrionário.

Tabela 4. Síntese da bibliografia levantada acerca do Diuron.

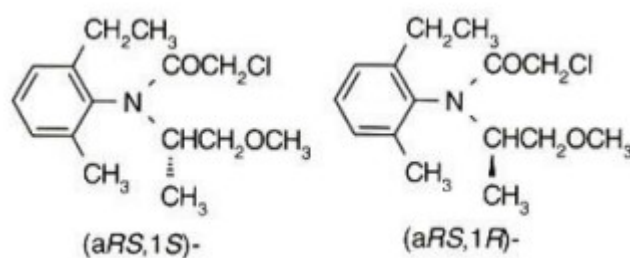
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Kao <i>et al.</i> (2019)	Diuron puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 24h e 48h	Em 25 µg/mL, após 48h, 30% apresentaram malformação de coluna e 25% edema no pericárdio, a 12,5 µg/mL, 10% apresentaram malformações.
Velki <i>et al.</i> (2017)	Diuron puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	Taxa de mortalidade dose-dependente: 1 mg/L - 5%, 2 mg/L - 15%, 3,8 mg/L - 30%. Edema no pericárdio:

10% (2 mg/L) e 25% (3,8 mg/L).

5.5 S-metolachlor

O *S-metolachlor* [2-chloro-6'-ethyl-N-[(1*S*)-2-methoxy-1-methylethyl]acet-o-toluidide e 2-chloro-6'-ethyl-N-[(1*R*)-2-methoxy-1-methylethyl]acet-o-toluidide] (figura 10) é o princípio ativo de herbicidas seletivos, pré e pós-emergências que inibe a germinação de sementes ao prejudicar o processo mitótico delas (Liu *et al.*, 2022). Usado comumente em culturas de algodão, cana-de-açúcar, feijão, milho e soja, essa substância e de uso e comercialização controlados e permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA (g) 2022). Dessa forma, os padrões toxicológicos desse princípio no país são: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,1 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = não se aplica (ANVISA, 2022)

Figura 10 . Fórmula estrutural *S-metolachlor*



Fonte: ANVISA monografia autorizada S13, 2022

Dos estudos com esse herbicida, em Liu *et al.* embriões de *zebrafish* 2 horas após sua concepção foram expostos ao composto puro de *S-metachlor* nas concentrações de 15,0 mg/L, 22,5 mg/L, 33,7 mg/L, 50,6 mg/L, 75,9 mg/L para testes de toxicidade aguda e 0,1 mg/L para análises bioquímicas, transcriptômicas e morfológicas por 48h e 96h. Dessa forma, os resultados do estudo estimaram, para esse composto, a LC₅₀ de 46,29 mg/L após 48h de exposição, indicando toxicidade uma moderada, e de 40,17 mg/L após 96h de exposição, como mostrado em outros estudos. Os embriões expostos a concentração de 0,1 mg/L tiveram a taxa de eclosão reduzida em relação ao controle, apresentaram malformações como estrutura corporal reduzida, indução de apoptose de forma moderada e aumento do estresse oxidativo com aumento da atividade da enzimática como a da Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione S-Transferase (Liu *et al.*, 2022). Já em Quintaneiro *et al.*, os embriões de *zebrafish* 3h após a sua concepção foram expostos ao composto puro de *S-metachlor* por 96h nas concentrações de 5,0 mg/L, 12,1 mg/L, 18,7 mg/L, 29,0 mg/L, 45,1 mg/L e 70,0 mg/L para testes de toxicidade aguda, 0,5 mg/L, 1,5 mg/L, 3,4 mg/L, 9,4 mg/L,

25,0 mg/L para ensaios bioquímicos e 9,66 mg/L para testes de expressão gênica. O estudo concluiu que, após 96h, a LC50 do composto foi 46,21 mg/L (Intervalo de Confiança entre 40,80 mg/L e 52,73 mg/L), nas concentrações maiores ou iguais a 45,1 mg/L a taxa de eclosão foi nula e os embriões desenvolveram edema pericárdico, deformação da cauda e uma absorção comprometida do saco vitelino. Além disso, os testes bioquímicos indicaram que na concentração de 25,0 mg/L atividade reduzida das enzimas Cholinesterases indicando neurotoxicidade, em todas as concentrações houve redução da atividade da Peroxidação Lipídica indicando inibição do metabolismo lipídico, típico de herbicidas do grupo das cloroacetamidas e, por fim, os testes moleculares em concentração 9,66 mg/L mostraram inibição do gene Cyp19a2, indicando impacto na esteroidogênese, aumento de Sox9b indicando danos no desenvolvimento cardíaco (Quintaneiro *et al.*, 2017). Por fim, Yang *et al.*, também verifica a toxicidade do composto puro de *S-metolachlor* em embriões de *zebrafish* nas concentrações de 0.5 μ M (141.9 μ g/L), 1 μ M (283.79 μ g/L), 2.5 μ M (709.45 μ g/L), 5 μ M (1.42 mg/L), 10 μ M (2.84 mg/L), 25 μ M (7.10 mg/L), 50 μ M (14.20 mg/L), 100 μ M (142.0 mg/L), 200 μ M (184 mg/L) e 400 μ M (358 mg/L) após 96h de exposição. Dos resultados, a partir da concentração de 50 μ M a taxa de mortalidade, a porcentagem de embrião com malformações (edema do pericardio e morfologia irregular de estatura e coluna) e a inibição de eclosão aumenta progressivamente até atingir a totalidade na concentração de 100 μ M. Além disso as enzimas Glutathione-S-transferase e Catalase tiveram aumento da sua atividade sugerindo aumento do estresse oxidativo, também houve irregularidades na Peroxidação Lipídica (Yang *et al.*, 2021).

Assim, os dados apresentados na Tabela 5 demonstra a relação entre os diferentes estudos sobre os efeitos do *S-metolachlor* no desenvolvimento embrionário.

Tabela 5. Síntese da bibliografia levantada acerca do *S-metolachlor*.

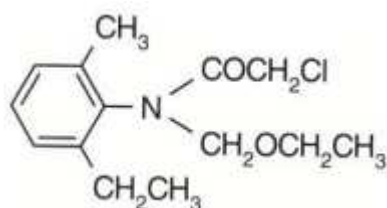
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Liu <i>et al.</i> (2022)	<i>S-metolachlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 48h e 96h	LC50: 46,29 mg/L (48h); 40,17 mg/L (96h). Redução da taxa de eclosão, malformações, apoptose moderada, aumento do estresse oxidativo
Yang <i>et al.</i> (2021)	<i>S-metolachlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	$\geq 50 \mu$ M: Mortalidade e malformações progressivas. Em 100 μ M: Taxa de mortalidade e inibição de eclosão total. Houve aumento do estresse oxidativo e irregularidades

				na peroxidação lipídica.
Quintaneiro <i>et al.</i> (2017)	<i>S-metolachlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	LC50: 46,21 mg/L. $\geq 45,1$ mg/L: Taxa de eclosão nula e malformações. 25,0 mg/L: Neurotoxicidade. 9,66 mg/L: Inibição de Cyp19a2 e aumento de Sox9b.

5.6 *Acetochlor*

O *Acetochlor* (2-chloro-N-ethoxymethyl-6'-ethylaceto-o-toluidide) (Figura 11) é um princípio ativo da família da cloroacetamida junto com o *S-metachlor*, portanto, ele é encontrado em herbicidas pré-emergenciais atuando na inibição da síntese proteica das plantas alvos. (Huang *et al.*, 2021). Usado principalmente em culturas de algodão, café, cana-de-açúcar, soja e milho, esse composto é de uso e comercialização permitidos e controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária tendo os padrões toxicológicos de: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,01 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 1,0 mg/kg peso corpóreo (ANVISA, 2022).

Figura 11 . Fórmula estrutural *Acetochlor*

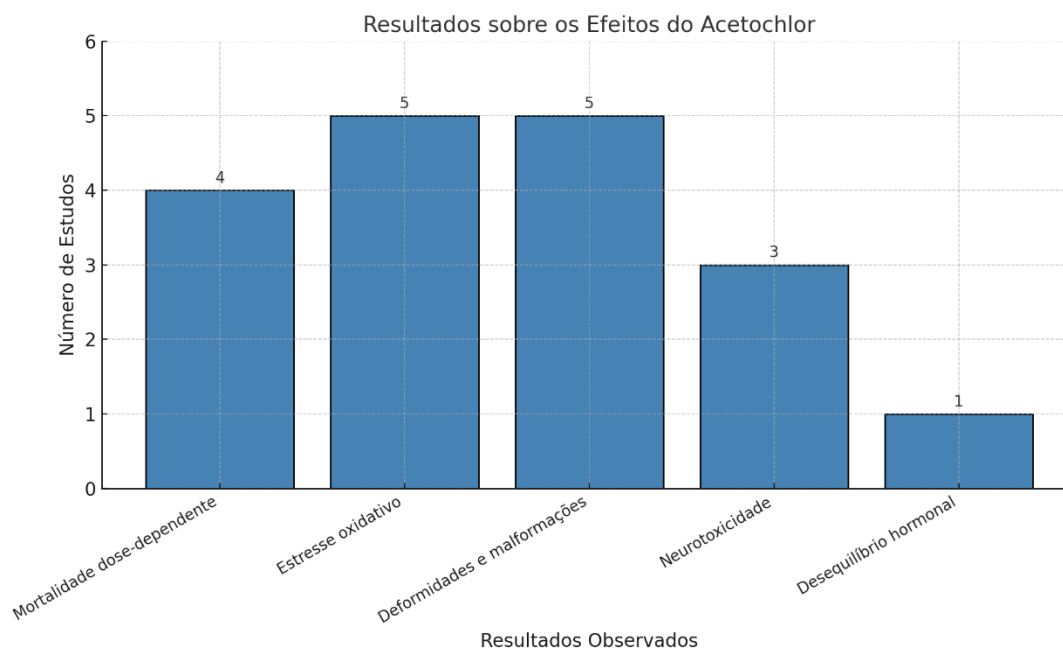


Fonte: ANVISA monografia autorizada A24, 2022

Dos estudos com esse composto, em Ma *et al.* embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de *Acetochlor* nas concentrações de 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M por 120h, com isso, concluiu-se que nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M houve aumento substancial da taxa de mortalidade entre os embriões, diminuição da taxa de eclosão, aumento da taxa de apoptose, aumento no nível de estresse oxidativo e aumento da incidência de deformidade como edema do pericárdio, desenvolvimento anormal da coluna vertebral e do saco vitelino, na concentração de 10 μ M foram observadas lesões leves principalmente o edema. (Ma *et al.*, 2021). Em Huang *et al.*, os embriões de *zebrafish* foram expostos por até 6 dias ao composto puro de *Acetochlor* nas concentrações 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 125 μ M. Assim, os resultados desse estudo concluíram que, de forma mais significativa, nas concentrações de 6,25 μ M e 12,5 μ M houve alterações bioquímicas e sinais de estresse oxidativo no embrião, na concentração de 25 μ M houve deformidades físicas, atraso no desenvolvimento, aumento de espécies reativas de oxigênio e redução na atividade

locomotora e nas concentrações mais altas de 50 μM a 125 μM houve grande aumento da mortalidade, maior taxa de malformações, alto estresse oxidativo e comprometimento da respiração mitocondrial (Huang *et al.*, 2021). Em Wang *et al.*, embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de *Actochlor* nas concentrações de 5 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L por até 6 dias e os resultados mostram que, de forma dose-dependente, os embriões apresentaram malformações cerebrais, de coluna vertebral e edemas no pericárdio e edema no saco vitelino, houve também diminuição da atividade da Acetilcolinesterase, indicando neurotoxicidade, aumento de estresse oxidativo e da apoptose (Wang *et al.*, 2019). No estudo de Wang *et al.*, 2023 e 2024 o autor explora a propriedade quiral do *Acetochlor* e seus efeitos no embrião de *zebrafish*, assim, no estudo de 2023 o composto puro de *Acetochlor* teve seus isômeros separados e colocados para interagir com embriões nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$ e 11 $\mu\text{g/mL}$ por 72h. Os resultados concluíram que no tratamento com concentrações até 7 $\mu\text{g/mL}$ a taxa de mortalidade não teve diferenças significativas em relação ao controle, nas concentrações maiores houve aumento significativo dessa taxa, além disso, concluiu que o isômero S causou malformações em 84,10% dos embriões, enquanto o R causou 15,07% e a mistura dos dois 57,51%, sendo essas deformações o edema no saco vitelino e no pericárdio, lesões no sistema cardiovascular e malformação na coluna espinal e no crânio. A mistura dos compostos e o isômero S também aumentaram o estresse oxidativo de forma significativa, o acúmulo de lipídio e o nível de apoptose (Wang *et al.*, 2023). Já em 2024, o estudo expôs os embriões a concentração de 7 $\mu\text{g/mL}$ dos isômeros do *Acetochlor* e da mistura deles, os testes feitos concluíram que o isômero S se mostrou mais neurotóxico do que os demais compostos com a redução da expressão dos genes relacionados ao desenvolvimento neural, como ROBO2, OTPA, GAD1B E GAD2, também provou de maneira mais severa danos cardiovasculares e aumento das espécies reativas de oxigênio (Wang *et al.*, 2024). Semelhante a isso, Xu *et al.* também expôs embriões de *zebrafish* aos isômeros *Actochlor* e a mistura dele nas concentrações de 1 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$ por 72h e também concluiu que as taxas totais de malformações aumentaram com a concentração do composto e foram mais frequentes nos embriões expostos ao isômero S, esse comportamento se repetiu nos testes de hormônios tireoidianos mostrando que os embriões expostos ao isômero S tiveram aumento nos níveis de Tiroxina (T4) e diminuição de Triiodotironina (T3), mostrando que o composto causa desequilíbrio no sistema endócrino (Xu *et al.*, 2019).

Portanto, os dados apresentados na Tabela 6 e na Figura 12 demonstram a relação entre os diferentes estudos sobre os efeitos do *Acetochlor* no desenvolvimento embrionário.

Figura 12 . Gráfico quantitativo dos resultados acerca dos efeitos da *Acetochlor*

Fonte: Criado pelo Autor

Tabela 6. Síntese da bibliografia levantada acerca do *Acetochlor*.

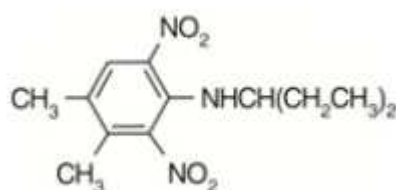
Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Ma <i>et al.</i> (2021)	<i>Acetochlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 120h	50 µM e 100 µM: Aumento da mortalidade, da apoptose, estresse oxidativo, edema no pericárdio, deformidades na coluna e redução da taxa de eclosão. 10 µM: Lesões leves.
Huang <i>et al.</i> (2021)	<i>Acetochlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 6 dias	6,25 µM e 12,5 µM: Alterações bioquímicas e estresse oxidativo. 25 µM: Deformidades, atraso no desenvolvimento. ≥50 µM: Alta mortalidade e malformações severas.
Wang <i>et al.</i> (2019)	<i>Acetochlor</i> puro	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	Dose-dependente: Malformações cerebrais e na coluna, edemas no pericárdio e saco vitelino, neurotoxicidade, estresse oxidativo e apoptose.
Wang <i>et al.</i> (2023)	<i>Acetochlor</i> (isômeros S e R)	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 72h	≥9 µg/mL: Aumento da mortalidade. Isômero S: 84,10% das deformações; Isômero R: 15,07%; Mistura: 57,51%.
Wang <i>et al.</i>	<i>Acetochlor</i> (isômeros S e R)	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura	Isômero S: Maior neurotoxicidade. Danos

(2024)			misturado com o tóxico 72h	cardiovasculares severos, aumento de espécies reativas de oxigênio.
Xu <i>et al.</i> (2019)	Acetochlor (isômeros S e R)	Zebrafish	Meio de cultura misturado com o tóxico 72h	Aumento da malformação com a concentração, mais frequente no isômero S. Alterações hormonais: Aumento de T4 e redução de T3, indicando desequilíbrio endócrino.

5.7 Pendimetalina

A pendimetalina [*N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine*] (Figura 13) é um princípio ativo de herbicidas seletivos pré-emergenciais e atua especificamente inibindo a formação de microtúbulos durante a divisão celular das ervas-daninhas (Wang *et al.*, 2022). Usado principalmente em culturas de fumo, algodão, cítricos, cana-de açúcar e eucalipto, a Pendimetalina é um composto de uso e comercialização permitidos e controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária tendo os padrões toxicológicos de: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,1 mg/kg peso corpóreo; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 1,0 mg/kg peso corpóreo (ANVISA, 2022)

Figura 13 . Fórmula estrutural Pendimetalina



Fonte: ANVISA monografia autorizada P05, 2022

Dos estudos com esse composto, Meng *et al.* expôs embriões de *zebrafish* ao composto puro de Pendimetalina nas concentrações de 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L, 5 mg/L, 6 mg/L, 7 mg/L e 8 mg/L por 72h e concluiu que nas menores concentração a taxa de mortalidade não foi significativa, porém na concentração de 3 mg/L a taxa de mortalidade foi 10%, a 5 mg/L foi 20% e a 7 mg/L houve 35% de mortalidade. Esse padrão se repetiu nas malformações com nas concentrações baixas a presença de edemas no pericardio e no saco vitelino do embrião e nas concentrações médias e altas há malformação da coluna vertebral, nas concentrações de 5 mg/L e 7 mg/L houve aumento das espécies reativas de oxigênio e a taxa de apoptose aumentou conforme a concentração de Pendimetalina (Meng *et al.*, 2021).

No estudo de Wang *et al.*, embriões de zebrafish também foram expostos ao composto puro de Pendimetalina a diferentes concentrações, nele foram utilizadas as concentrações de 1 μM , 2,5 μM , 5 μM e 25 μM pelo período de até 7 dias, o estudo concluiu que a Pendimetalina mostrou toxicidade dose-dependente com impactos severos em concentrações acima de 2,5 μM . Assim, na concentração de 25 μM a taxa de mortalidade foi máxima no 4º dia de exposição, malformação da espinha, estatura reduzida edema do saco vitelino e edema pericárdico foram predominantes nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM , com maior severidade em concentrações mais altas (Wang *et al.*, 2022). Em Merola *et al.*, embriões de *zebrafish* foram expostos ao composto puro de Pendimetalina nas concentrações de 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L e 3 mg/L e o estudo concluiu que a LC50 do composto, após uma exposição de 96h foi de 2,81 mg/L e a mortalidade se mostrou dose-dependente em concentrações acima de 2 mg/L, as malformações também foram dose dependentes e foram presentes em todas as concentrações e se caracterizaram com edemas no pericardio e saco vitelínico, diminuição de batimentos cardíacos, alterações estruturais de tecidos, deformidades na coluna vertebral e atraso em sua mineralização, houve aumento da atividade da catalase indicando aumento do estresse oxidativo e aumento da atividade da acetilcolinesterase indicando danos no sistema nervoso (Merola *et al.*, 2022). Por fim, Greenlee *et al.* também utilizou embriões de camundongos CD-1 para verificar a toxicidade da Pendimetalina na concentração de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ durante 96h de exposição, em seus resultados o artigo destaca que 76,7% dos embriões tratados com pendimetalina atingiram o estágio de blastocisto, a taxa de apoptose foi de 12,47% e significativamente aumentada em relação ao controle e houve redução no número de células do embrião (Greenlee *et al.*, 2004).

Assim, os dados apresentados na Tabela 7 demonstra a relação entre os diferentes estudos sobre os efeitos da Pendimetalina no desenvolvimento embrionário.

Tabela 7. Síntese da bibliografia levantada acerca da Pendimetalina.

Estudo	Substância	Modelo	Exposição	Resultados
Meng <i>et al.</i> (2021)	Pendimetalina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 72h	Mortalidade: 3 mg/L (10%), 5 mg/L (20%), 7 mg/L (35%). Malformações: Edema no pericárdio e saco vitelino em baixas concentrações; defeito na coluna em concentrações médias e altas.
Wang <i>et al.</i> (2022)	Pendimetalina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o	Toxicidade dose-dependente. 25 μM : Mortalidade máxima no 4º dia. Malformações: Espinha,

			tóxico 7 dias	estatura reduzida e edemas nas concentrações de 2,5 μ M e 5 μ M.
Merola <i>et al.</i> (2022)	Pendimetalina pura	<i>Zebrafish</i>	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	LC50: 46,21 mg/L. $\geq$ 45,1 mg/L: Taxa de eclosão nula e malformações. 25,0 mg/L: Neurotoxicidade. 9,66 mg/L: Inibição de Cyp19a2 e aumento de Sox9b.
Greenlee <i>et al.</i> (2004)	Pendimetalina pura	Camundongo CD-1	Meio de cultura misturado com o tóxico 96h	76,7% dos embriões atingiram estágio de blastocisto. Taxa de apoptose aumentada e redução no número de células do embrião.

6 – CONCLUSÃO

Este trabalho investigou, de forma abrangente, a viabilidade do uso de embriões como modelos alternativos para a avaliação da toxicidade de herbicidas. Os resultados obtidos sugerem que o uso de modelos alternativos para avaliação toxicológica ainda é pouco explorado no contexto agroquímico, uma vez que apenas 34 artigos respeitaram os critérios desta revisão. Com eles é possível compreender parcialmente o comportamento toxicológico de diferentes compostos quando aplicados em alguns embriões de *zebrafish*, de anfíbios ou de camundongos. Observa-se, de forma consistente, que as exposições aos princípios ativos dos herbicidas induziram estresse oxidativo, apoptose e alterações morfofuncionais significativas, indicando a sensibilidade desses modelos à presença desses agentes químicos.

Contudo, nota-se limitações importantes que restringem, em certa medida, a generalização dos resultados obtidos. Primeiramente, a escassez de literatura científica consolidada acerca do uso de embriões como modelo alternativo para testes de toxicidade de herbicidas impõe uma barreira significativa ao avanço dessa abordagem, limitando comparações robustas e aprofundadas. Além disso, a ausência de protocolos padronizados para a realização desses testes acarreta variações metodológicas que dificultam a reprodutibilidade e a extrapolação dos resultados. Soma-se a isso a enorme heterogeneidade dos princípios ativos e formulações comerciais presentes no mercado, que tornam o espectro de análise amplamente diversificado e complexo. Apesar dessas restrições, os resultados apresentados reforçam o potencial de modelos embrionários como ferramentas promissoras para investigações toxicológicas. Sua alta sensibilidade, aliada à possibilidade de reduzir o uso de modelos animais convencionais, posiciona-os como alternativas eticamente

responsáveis e cientificamente válidas. Ainda assim, para que essa abordagem alcance um grau de aplicabilidade mais robusto, é necessário que ocorra à padronização metodológica e o desenvolvimento de uma base de dados ampla e consolidada sobre os efeitos de diferentes formulações de herbicidas.

Dessa forma, o presente estudo contribui de maneira significativa para o avanço do conhecimento sobre o uso de embriões em testes toxicológico de herbicidas, pois denuncia a falta de estudos explorando esse modelo tornando evidente a necessidade de uma padronização nesses testes para que seja possível inferir a real toxicidade de cada produto e princípio ativo disponível no mercado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S.; BASKETTER, D.; CRETON, S.; PELKONEN, O. *et al.* Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. **Arch Toxicol**, 85, n. 5, p. 367-485, May 2011.

AGOSTINI, L. P.; DETTOGNI, R. S.; DOS REIS, R. S.; STUR, E. *et al.* Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. **Sci Total Environ**, 705, p. 135808, Feb 25 2020.

AHKIN CHIN TAI, J. K.; HORZMANN, K. A.; FRANCO, J.; JANNASCH, A. S. *et al.* Developmental atrazine exposure in zebrafish produces the same major metabolites as mammals along with altered behavioral outcomes. **Neurotoxicol Teratol**, 85, p. 106971, May-Jun 2021.

ALMBERG, K. S.; TURYK, M. E.; JONES, R. M.; RANKIN, K. *et al.* Atrazine Contamination of Drinking Water and Adverse Birth Outcomes in Community Water Systems with Elevated Atrazine in Ohio, 2006-2008. **Int J Environ Res Public Health**, 15, n. 9, Aug 31 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas A14. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas A24. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4147json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas D25. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4283json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas D27. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4285json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas G01. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4378json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas P05. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4464json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas S13. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/q-r-s/4515json-file-1>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Protocolo para realização de estudos de toxicidade reprodutiva: Guia nº 51/2021, versão 1, de 14/10/2021. Disponível em: <https://anexosportal.datalegis.net/arquivos/1339630.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2024.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Disponível em: https://anvisalegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&link=S&tipo=RDC&numeroAto=00000294&seqAto=000&valorAto=2019&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&cod_modulo=310&cod_menu=8542. Acesso em: 7 nov. 2024.

ARIAS, E. Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. **Ecotoxicol Environ Saf**, 55, n. 3, p. 338-343, Jul 2003.

BAUER, B.; MALLY, A.; LIEDTKE, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. **Int J Mol Sci**, 22, n. 24, Dec 14 2021.

BAYNE, K.; TURNER, P. V. Animal Welfare Standards and International Collaborations. **ILAR Journal**, 60, n. 1, p. 86-94, 2019.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Projeto de Lei 5080/2023 – Trâmite Legislativo. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2397900>. Acesso em: 1 nov. 2024

CHU, P. Y.; KOH, A. P.; ANTONY, J.; HUANG, R. Y. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. **Cells Tissues Organs**, 211, n. 2, p. 222-237, 2022.

CORREIA, N. M. Herbicidas. Informe Agropecuário, v. 42, n. 315, p. 48-58, 2021.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D. *et al.* The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicol Lett**, 142, n. 1-2, p. 45-52, Apr 30 2003.

DRIESSEN, M.; KIENHUIS, A. S.; PENNING, J. L.; PRONK, T. E. *et al.* Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. **Arch Toxicol**, 87, n. 5, p. 807-823, May 2013.

ESTIENNE, A.; FRÉVILLE, M.; BOURDON, G.; RAMÉ, C. *et al.* Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. **Ecotoxicol Environ Saf**, 241, p. 113741, Aug 2022.

FRANCO, N. H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. **Animals (Basel)**, 3, n. 1, p. 238-273, Mar 19 2013.

FREIRES, I. A.; SARDI, J. C.; DE CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharm Res**, 34, n. 4, p. 681-686, Apr 2017.

GHIMIRE, S.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; WU, C. Use of Chicken Embryo Model in Toxicity Studies of Endocrine-Disrupting Chemicals and Nanoparticles. **Chem Res Toxicol**, 35, n. 4, p. 550-568, Apr 18 2022.

GREENLEE, A. R.; ELLIS, T. M.; BERG, R. L. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. **Environ Health Perspect**, 112, n. 6, p. 703-709, May 2004.

GRZYMKOWSKI, J. K.; CHIU, Y. C.; JIMA, D. D.; WYATT, B. H. *et al.* Developmental regulation of cellular metabolism is required for intestinal elongation and rotation. **Development**, 151, n. 4, Feb 15 2024.

HARPER, A. P.; FINGER, B. J.; GREEN, M. P. Chronic Atrazine Exposure Beginning Prenatally Impacts Liver Function and Sperm Concentration With Multi-Generational Consequences in Mice. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 11, p. 580124, 2020.

HEGEMANN, N.; BINTIG, W.; PERRET, P. L.; REES, J. *et al.* In-ovo echocardiography for application in cardiovascular research. **Basic Res Cardiol**, 118, n. 1, p. 19, May 16 2023.

HO, D. C. **Principais agrotóxicos em uso no Brasil: toxicidade, risco e comparação com a União Europeia**. 2020. -, Universidade de São Paulo.

HORZMANN, K. A.; LIN, L. F.; TASLAKJIAN, B.; YUAN, C.; FREEMAN, J. L. Embryonic atrazine exposure and later in life behavioral and brain transcriptomic, epigenetic, and pathological alterations in adult male zebrafish. **Cell Biol Toxicol**, 37, n. 3, p. 421-439, Jun 2021.

HORZMANN, K. A.; REIDENBACH, L. S.; THANKI, D. H.; WINCHESTER, A. E. *et al.* Embryonic atrazine exposure elicits proteomic, behavioral, and brain abnormalities with developmental time specific gene expression signatures. **J Proteomics**, 186, p. 71-82, Aug 30 2018.

HUANG, T.; WANG, S.; SOUDERS, C. L., 2ND; IVANTSOVA, E. *et al.* Exposure to acetochlor impairs swim bladder formation, induces heat shock protein expression, and promotes locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Ecotoxicol Environ Saf**, 228, p. 112978, Nov 15 2021.

ITOH, K.; REIS, A. H.; HAYHURST, A.; SOKOL, S. Y. Isolation of nanobodies against *Xenopus* embryonic antigens using immune and non-immune phage display libraries. **PLoS One**, 14, n. 5, p. e0216083, 2019.

JOFRÉ, D. M.; ALVAREZ, M. D. F.; PEREZ, E.; MOHAMED, F. *et al.* Studies of acute and chronic toxicity of commercial herbicides with glyphosate against *Danio rerio*. 2015.

JOHNSTON, H. J.; VERDON, R.; GILLIES, S.; BROWN, D. M. *et al.* Adoption of in vitro systems and zebrafish embryos as alternative models for reducing rodent use in assessments of immunological and oxidative stress responses to nanomaterials. **Crit Rev Toxicol**, 48, n. 3, p. 252-271, Mar 2018.

KAO, C. M.; OU, W.-J.; LIN, H.-D.; EVA, A. W. *et al.* Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 172, p. 432-438, 2019/05/15/ 2019.

KILSOO, W. J. A. G.-H. L. **Why do we always care about the welfare of laboratory animals?** Open Access Government, 2023. Disponível em: <https://www.openaccessgovernment.org/article/why-do-we-always-care-about-welfare-laboratory-animals/161570/>. Acesso em: 02/18.

KIM, T.-W.; CHE, J. H.; YUN, J.-W. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, 105, p. 15-29, 2019.

- KURTH, T.; WEICHE, S.; VORKEL, D.; KRETSCHMAR, S.; MENGE, A. Histology of plastic embedded amphibian embryos and larvae. **Genesis**, 50, n. 3, p. 235-250, Mar 2012.
- LEHEL, J.; SZEMERÉDY, G.; SZABÓ, R.; MAJOR, L. *et al.* Reproductive toxicological changes in avian embryos due to a pesticide and an environmental contaminant. **Acta Vet Hung**, Nov 8 2021.
- LENKOWSKI, J. R.; MCLAUGHLIN, K. A. Acute atrazine exposure disrupts matrix metalloproteinases and retinoid signaling during organ morphogenesis in *Xenopus laevis*. **J Appl Toxicol**, 30, n. 6, p. 582-589, Aug 2010.
- LI, K.; WU, J.-Q.; JIANG, L.-L.; SHEN, L.-Z. *et al.* Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, 171, p. 40-48, 2017/03/01/ 2017.
- LIU, S.; WANG, L.; CHEN, K.; YANG, H. *et al.* Combined effects of S-metolachlor and benoxacor on embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 238, p. 113565, 2022/06/15/ 2022.
- MA, X.; ZHANG, Y.; GUAN, M.; ZHANG, W. *et al.* Genotoxicity of chloroacetamide herbicides and their metabolites in vitro and in vivo. **Int J Mol Med**, 47, n. 6, Jun 2021.
- MARCATO, A.; DE SOUZA, C.; FONTANETTI, C. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, 228, 03/02 2017.
- MARCHI, G.; MARCHI, E.; GUIMARÃES, T. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. 2008a. 1517-5111.
- MARTINS, R. X.; VIEIRA, L.; SOUZA, J.; SILVA, M. G. F. *et al.* Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 248, p. 109110, Oct 2021.
- MCCAUSLAND, C. The Five Freedoms of Animal Welfare are Rights. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, 27, n. 4, p. 649-662, 2014/08/01 2014.
- MENEGOLA, E.; BROCCIA, M. L.; DI RENZO, F.; PRATI, M.; GIAVINI, E. In vitro teratogenic potential of two antifungal triazoles: triadimefon and triadimenol. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 36, n. 2, p. 88-95, Feb 2000.
- MENG, Y.; ZHONG, K.; CHEN, S.; HUANG, Y. *et al.* Cardiac toxicity assessment of pendimethalin in zebrafish embryos. **Ecotoxicol Environ Saf**, 222, p. 112514, Oct 1 2021.
- MEROLA, C.; FABRELLO, J.; MATOZZO, V.; FAGGIO, C. *et al.* Dinitroaniline herbicide pendimethalin affects development and induces biochemical and histological alterations in zebrafish early-life stages. **Sci Total Environ**, 828, p. 154414, Jul 1 2022.
- 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. **Chem Res Toxicol**, 23, n. 10, p. 1586-1595, Oct 18 2010.
- PATHAK, V. M.; VERMA, V. K.; RAWAT, B. S.; KAUR, B. *et al.* Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. **Front Microbiol**, 13, p. 962619, 2022.
- PERKINS, E. J.; ANKLEY, G. T.; CROFTON, K. M.; GARCIA-REYERO, N. *et al.* Current perspectives on the use of alternative species in human health and ecological hazard assessments.

Environ Health Perspect, 121, n. 9, p. 1002-1010, Sep 2013.

POSFAL, E.; LANNER, F.; MULAS, C.; LEITCH, H. G. All models are wrong, but some are useful: Establishing standards for stem cell-based embryo models. **Stem Cell Reports**, 16, n. 5, p. 1117-1141, May 11 2021.

PRIOR, H.; CASEY, W.; KIMBER, I.; WHELAN, M.; SEWELL, F. Reflections on the progress towards non-animal methods for acute toxicity testing of chemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 102, p. 30-33, 2019/03/01/ 2019.

QUINTANEIRO, C.; PATRÍCIO, D.; NOVAIS, S. C.; SOARES, A.; MONTEIRO, M. S. Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. **Sci Total Environ**, 586, p. 390-400, May 15 2017.

RIZZO, L. Y.; GOLOMBEK, S. K.; MERTENS, M. E.; PAN, Y. *et al.* In vivo nanotoxicity testing using the zebrafish embryo assay. **Journal of Materials Chemistry B**, 1, n. 32, p. 3918-3925, 2013. 10.1039/C3TB20528B.

SARIGÖL KILIÇ, Z.; AYDIN, S.; ÜNDEĞER BUCURGAT, Ü.; BAŞARAN, N. In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. **Food and Chemical Toxicology**, 113, p. 90-98, 2018/03/01/ 2018.

SHAN, W.; HU, W.; WEN, Y.; DING, X. *et al.* Evaluation of atrazine neurodevelopment toxicity in vitro-application of hESC-based neural differentiation model. **Reproductive Toxicology**, 103, p. 149-158, 2021/08/01/ 2021.

SOGORB, M. A.; PAMIES, D.; DE LAPUENTE, J.; ESTEVAN, C. *et al.* An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. **Toxicol Lett**, 230, n. 2, p. 356-367, Oct 15 2014.

SOUKUP, S. T.; MERZ, B.; BUB, A.; HOFFMANN, I. *et al.* Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany. **Arch Toxicol**, 94, n. 5, p. 1575-1584, May 2020.

TURNER, P. V.; BARBEE, R. W. Responsible Science and Research Animal Use. **ILAR Journal**, 60, n. 1, p. 1-4, 2019.

UMANZOR-ALVAREZ, J.; WADE, E. C.; GIFFORD, A.; NONTAPOT, K. *et al.* Near-infrared laser delivery of nanoparticles to developing embryos: a study of efficacy and viability. **Biotechnol J**, 6, n. 5, p. 519-524, May 2011.

VAN SOOM, A.; WYDOOGHE, E.; HERAS, S.; VANDAELE, L. Alternative models for the study of embryo-maternal cross-talk and signaling molecules from fertilisation to implantation. **Reprod Fertil Dev**, 23, n. 8, p. iii-v, 2011.

VEISSIER, I.; AUBERT, A.; BOISSY, A. Animal welfare: A result of animal background and perception of its environment. **Animal Frontiers**, 2, n. 3, p. 7-15, 2012.

VELKI, M.; DI PAOLO, C.; NELLES, J.; SEILER, T. B.; HOLLERT, H. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. **Chemosphere**, 180, p. 65-76, Aug 2017.

WANG, H.; MENG, Z.; ZHOU, L.; CAO, Z. *et al.* Effects of acetochlor on neurogenesis and behaviour

in zebrafish at early developmental stages. **Chemosphere**, 220, p. 954-964, Apr 2019.

WANG, S.; LOPEZ, S.; EL AHMADIE, N.; WENGROVITZ, A. S. *et al.* Assessing sub-lethal effects of the dinitroaniline herbicide pendimethalin in zebrafish embryos/larvae (*Danio rerio*). **Neurotoxicol Teratol**, 89, p. 107051, Jan-Feb 2022.

WANG, X.; CHEN, F.; LU, J.; WU, M. *et al.* Developmental and cardiovascular toxicities of acetochlor and its chiral isomers in zebrafish embryos through oxidative stress. **Science of The Total Environment**, 896, p. 165296, 2023/10/20/ 2023.

WANG, X.; LI, S.; ZHANG, C.; XU, W. *et al.* Stereoselective toxicity of acetochlor chiral isomers on the nervous system of zebrafish larvae. **Journal of Hazardous Materials**, 464, p. 133016, 2024/02/15/ 2024.

WEBSTER, W. S.; BROWN-WOODMAN, P. D.; RITCHIE, H. E. A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. **Int J Dev Biol**, 41, n. 2, p. 329-335, Apr 1997.

WEIR, S. M.; YU, S.; SALICE, C. J. Acute toxicity of herbicide formulations and chronic toxicity of technical-grade trifluralin to larval green frogs (*Lithobates clamitans*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 31, n. 9, p. 2029-2034, 2012.

WIRBISKY-HERSHBERGER, S. E.; SANCHEZ, O. F.; HORZMANN, K. A.; THANKI, D. *et al.* Atrazine exposure decreases the activity of DNMTs, global DNA methylation levels, and dnmt expression. **Food Chem Toxicol**, 109, n. Pt 1, p. 727-734, Nov 2017.

WIRBISKY, S. E.; WEBER, G. J.; SEPÚLVEDA, M. S.; XIAO, C. *et al.* Developmental origins of neurotransmitter and transcriptome alterations in adult female zebrafish exposed to atrazine during embryogenesis. **Toxicology**, 333, p. 156-167, Jul 3 2015.

XU, C.; SUN, X.; NIU, L.; YANG, W. *et al.* Enantioselective thyroid disruption in zebrafish embryo-larvae via exposure to environmental concentrations of the chloroacetamide herbicide acetochlor. **Sci Total Environ**, 653, p. 1140-1148, Feb 25 2019.

YANG, L.; IVANTSOVA, E.; SOUDERS, C. L.; MARTYNIUK, C. J. The agrochemical S-metolachlor disrupts molecular mediators and morphology of the swim bladder: Implications for locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 208, p. 111641, 2021/01/15/ 2021.

ZHANG, W.; WANG, J.; SONG, J.; FENG, Y. *et al.* Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. **Ecotoxicol Environ Saf**, 226, p. 112854, Dec 15 2021.