



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE ATRAZINA EM  
EMBRIÕES DE AVE**

**GUSTAVO DE FRANÇA SILVA**

Foz do Iguaçu

2023

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE ATRAZINA EM  
EMBRIÕES DE AVE**

**GUSTAVO DE FRANÇA SILVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal da Integração Latino Americana – UNILA.

Orientadora: Prof. Dra. Marcela Boroski

Foz do Iguaçu

2023

GUSTAVO DE FRANÇA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE  
ATRAZINA EM EMBRIÕES DE AVE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcela Boroski  
UNILA

---

Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa  
UNILA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gilcelia Aparecida Cordeiro  
UNILA

Foz do Iguaçu, 25 de outubro de 2023.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Gustavo de França Silva

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento

(.....) graduação

(.....) artigo

(.....) especialização

(X) trabalho de conclusão de curso

(.....) mestrado

(.....) monografia

(.....) doutorado

(.....) dissertação (.....) tese

(.....) CD/DVD – obras audiovisuais

(.....)

Título do trabalho acadêmico: **Desenvolvimento de protocolo para análise de atrazina em embriões de ave**

Nome do orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcela Boroski

Data da Defesa: 25 de outubro de 2023

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 25 de outubro de 2023.

---

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho à minha família que esteve ao meu lado desde o início, sobretudo à minha avó Gilda, que não pode estar agora no fim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às minhas orientadoras Carla Vermeulen Carvalho Grade e Marcela Boroski por toda a orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. Quero agradecer imensamente por todo o conhecimento e senso de responsabilidade que ambas puderam me ensinar através de suas próprias perspectivas. Em muitos momentos pude sentir o esforço, a determinação, a sensibilidade, a empatia, a preocupação e a felicidade de vocês duas frente a cada desafio superado no caminho, e sabemos que foram muitos. Dito isso, tenho apenas o mais sincero sentimento de respeito e admiração, foi um grande aprendizado profissional e pessoal.

Agradeço aos meus pais, Cláudio e Joselma, em segundo lugar, pois nada do que eu realizei até aqui seria possível sem vocês. Obrigado pela confiança de me deixarem ir atrás de um sonho, pela persistência de correr atrás desse sonho comigo, por contribuir com cada palavra de conforto e por sempre estarem dispostos a considerar minhas ideias malucas e confiarem no meu potencial. Eu amo vocês.

Agradeço às minhas mestrandas Sabrina e Luana, por toda a disposição de ensinar as suas experiências a uma pessoa que estava com muita vontade de aprender, mas com muito medo de errar. Vocês me ensinaram a como viver em laboratório e manter o profissionalismo, sempre me divertindo no processo. Com vocês eu chorei, desabafei e reclamei sobre muitas coisas, mas vocês também foram as primeiras pessoas que pularam de alegria comigo quando algo dava certo. Obrigado por responderem minhas mensagens nos horários mais inapropriados e, acima de tudo, pela amizade e companheirismo.

Agradeço à Beatriz Arcain, aos professores da UNILA, aos técnicos dos laboratórios, à criadora do Sci-Hub, aos servidores que responderam meus emails e a todas as pessoas que me ajudaram a desenvolver alguma parte do meu trabalho. Um agradecimento especial aos meus amigos do laboratório do Projeto Aves, em especial ao Mateo, e aos meus amigos do laboratório de química, Agatha, Nédice e Angie, por todo o companheirismo e ajuda dentro do laboratório, cada dia de

trabalho se tornou um dia mais leve com vocês, e saibam que sem vocês, metade deste trabalho não teria sido feito. Agradeço pelas risadas e pela amizade.

Agradeço aos meus amigos de Foz do Iguaçu, vocês foram o motivo de eu ter continuado nessa cidade, as pessoas que eu compartilhei meus sentimentos, fossem eles bons ou ruins, e que me acolheram. Bernie, Brandon, Carol, Daniel, Diego, Dio, Douglas, Gabrielli, Grecia, Hussein, Iaz, Jonas, Jonathan, Laís, Lucas, Luis, Marcel, Mateo, Miguel, Neuman, Paty, Santi, Susana e Yara, vocês estão entre pessoas que passaram pela minha vida e me marcaram de alguma forma, tal como diversas outras pessoas maravilhosas que conheci nessa cidade, muito obrigado pelas risadas que várias vezes nós demos, e pelos momentos particulares com cada um.

Agradeço aos meus grupinhos apocalípticos que precisam de um pouco mais de destaque, os próximos trechos são para vocês. Kau, Emilly, Edu e Killik, esse parágrafo poderia ser um texto do tamanho desse TCC só sobre o quanto vocês me marcaram, pois sinto não apenas que vocês foram minha família, mas que vocês foram responsáveis por quem eu sou hoje. Ainda mais, do meu jeitinho delicado, sempre tentei retribuir essa gratidão, então fico feliz de fazer parte do crescimento de vocês também também. Eu simplesmente os amo, e só consigo ter lembranças boas enquanto estou escrevendo essas frases, então espero que esse meu sentimento seja o suficiente para o tanto de agradecimentos que 5 anos puderam acumular.

Agradeço aos meus veteranos favoritos, Luiz, Giovana, Agatha, Andres e Nédice, pela aproximação que veio em decorrência da minha vida universitária. Ter encontrado o carinho e a amizade de vocês no meio de tantas coisas com toda certeza me salvou, pois a proporção de decepções nunca será tão importante frente à proporção de surpresas que temos na vida, e vocês foram surpresas que entraram no meu caminho no momento certo.

Agradeço aos meus amigos de turma Kauana, Lia, João, Heveli e Isa por toda essa loucura que foram esses 5 anos de curso. Matérias horríveis foram suportáveis, matérias ruins foram boas, e matérias boas foram perfeitas, e tudo isso pois vocês estavam ao meu lado. Obrigado por todo tempo dentro e fora da

faculdade, e aliás obrigado pelo futuro, pois saímos todos da mesma largada, então pretendo estar presente na chegada de cada um também.

Agradeço aos meus amigos e à minha família em São Paulo, e aqui contêm uma lista grande, que me apoiaram a distância por 5 anos mesmo com meus sumiços por meses. Grande parte dessa luta foi por e devido à vocês também. Caio, Giovanna, Vitória, Gabriela, Vinícios, Arlinda, Malu, Nath, Ana Bia, Arthur, Raissa, Well, Ramos, Thawanny, Henrique, eu quero compensar todo esse tempo longe de vocês, mas no momento quero deixar meu agradecimento pois mesmo após tantos anos vocês continuarem sendo meu porto seguro. A energia de incentivo de vocês muitas vezes me deu forças para aguentar mais um dia, uma semana, um mês. Muito obrigado.

Agradeço à minha avó, onde quer que a senhora esteja, pois a senhora foi a minha segunda mãe. Me entristece muito que a senhora não esteja mais conosco para ver que meu momento finalmente chegou, mas sei que a sua bondade me ensinou a ser quem eu sou, me fez chegar até aqui, e vai me levar ao melhor lugar que o mundo me aguarda. Bença, vó!

Agradeço aos meus dois maiores amores, Fani e Zoe, por serem os melhores animais de estimação que eu poderia desejar.

Agradeço a mim, que por muitas e muitas vezes precisei sozinho retirar forças de onde eu nem imaginava ter para continuar seguindo na minha caminhada. Agradeço ao meu senso de responsabilidade e maturidade por todas as decisões que tomei até aqui, e devolvo o agradecimento a todas as pessoas que atingi positivamente em algum momento desta jornada.

Agradeço, finalmente, à Universidade Federal da Integração Latino-Americana, por ser o espaço físico que fez com que eu atingisse todas as minhas conquistas acadêmicas. Esse espaço precisa de mais incentivos, apoios, recursos, docentes, equipamentos, funcionários, bolsas, e muitos outros aspectos para realmente atingir não só uma educação de qualidade, mas também um espaço de permanência estudantil. Apesar desses pontos, só tenho a agradecer à UNILA por me tornar um cientista, ou melhor, um biotecnologista.



*Quem eu sou acho que me estaciona.  
Quem eu posso ser me mantém em  
movimento.*

**Rita Von Hunty**

## RESUMO

A atrazina é um herbicida seletivo sintético do grupo das triazinas, cuja atuação ocorre na inibição da fotossíntese das plantas não desejadas. Esse herbicida é utilizado principalmente em culturas de trigo e milho, porém casos de contaminação ambiental são comuns não só da atrazina, como também de seus dois principais metabólitos, DIA (desisopropilatrazina) e DEA (desetilatrazina). A contaminação em animais está associada com efeitos tóxicos, sendo relatada como desregulador endócrino em adultos, sejam machos ou fêmeas, mas também em embriões de diversas classes de animais, afetando a regulação hormonal e, conseqüentemente, os padrões de desenvolvimento desses indivíduos. Assim, visto que embriões de galinha (*Gallus gallus*) são animais modelo para estudos envolvendo o desenvolvimento embrionário, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para o estudo da bioacumulação de atrazina em embriões de aves. A metodologia utilizada baseou-se no tratamento *in ovo* de três grupos de embriões: um grupo controle com injeções de água destilada, um grupo tratado com injeções de solução de atrazina a 500 µg/L, e um grupo tratado com injeções de atrazina a 1000 µg/L. A coleta dos embriões ocorreu 7 dias após a incubação. Os embriões foram preparados para análise empregando a metodologia QuEChERS (acrônimo para Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro), seguido de análise por cromatografia em fase líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Realizou-se a validação analítica da metodologia, sendo avaliados a linearidade, resíduos da curva analítica, limite de detecção e limite de quantificação, e precisão. Com relação aos resultados obtidos, não houve a detecção da atrazina e de seus metabólitos em embriões, em nenhuma das concentrações administradas. Taxas de mortalidade e malformações também foram avaliadas, porém nenhuma discrepância significativa foi capaz de associar os efeitos da atrazina com desvios do padrão de desenvolvimento embrionário. Estudos futuros devem ser realizados para confirmar que embriões de aves não são capazes de bioacumular a atrazina e garantir que o uso desse agrotóxico não afeta a saúde dos animais a nível de desenvolvimento.

**Palavras-chave:** atrazina, embrião, desenvolvimento embrionário, bioacumulação cromatografia, validação analítica.

## RESUMEN

La atrazina es un herbicida selectivo sintético del grupo de las triazinas, cuya acción se centra en la inhibición de la fotosíntesis de las plantas no deseadas. Este herbicida se utiliza principalmente en cultivos de trigo y maíz, aunque los casos de contaminación ambiental son comunes no solo con atrazina, sino también con sus dos principales metabolitos, DIA (desisopropilatrazina) y DEA (desetilatrazina). La contaminación en animales está asociada con efectos tóxicos, informados como disruptores endocrinos en adultos, ya sean machos o hembras, así como en embriones de diversas clases de animales, afectando la regulación hormonal y, consecuentemente, los patrones de desarrollo de estos individuos. Dado que los embriones de pollo (*Gallus gallus*) son animales modelo para estudios que involucran el desarrollo embrionario, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para el estudio de la bioacumulación de atrazina en embriones de aves. La metodología utilizada se basó en el tratamiento in ovo de tres grupos de embriones: un grupo de control con inyecciones de agua destilada, un grupo tratado con inyecciones de solución de atrazina a 500 µg/L y un grupo tratado con inyecciones de atrazina a 1000 µg/L. La recolección de los embriones se realizó 7 días después de la incubación. Los embriones fueron preparados para el análisis utilizando la metodología QuEChERS (acrónimo de Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro), seguido de análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se llevó a cabo la validación analítica de la metodología, evaluando la linealidad, los residuos de la curva analítica, el límite de detección y el límite de cuantificación, así como la precisión. Con respecto a los resultados obtenidos, no se detectó atrazina ni sus metabolitos en los embriones, en ninguna de las concentraciones administradas. También se evaluaron tasas de mortalidad y malformaciones, pero no se encontró ninguna discrepancia significativa que pudiera asociar los efectos de la atrazina con desviaciones en el patrón de desarrollo embrionario. Se deben realizar estudios futuros para confirmar que los embriones de aves no son capaces de bioacumular atrazina y para asegurar que el uso de este pesticida no afecta la salud de los animales a nivel de desarrollo.

**Palabras-clave:** atrazina, embrión, desarrollo embrionario, bioacumulación, cromatografía, validación analítica.

## ABSTRACT

Atrazine is a synthetic selective herbicide from the triazine group, whose action occurs by inhibiting the photosynthesis of unwanted plants. This herbicide is primarily used in wheat and corn crops; however, cases of environmental contamination are common not only with atrazine but also with its two main metabolites, DIA (desisopropylatrazine) and DEA (desethylatrazine). Animal contamination is associated with toxic effects, reported as an endocrine disruptor in adults, both males and females, as well as in embryos of various animal classes, affecting hormonal regulation and, consequently, the developmental patterns of these individuals. Therefore, since chicken embryos (*Gallus gallus*) are model animals for studies involving embryonic development, the aim of this work was to develop a protocol for the study of atrazine bioaccumulation in bird embryos. The methodology used was based on in-ovo treatment of three groups of embryos: a control group with injections of distilled water, a group treated with atrazine solution injections at 500 µg/L, and a group treated with atrazine injections at 1000 µg/L. Embryo collection occurred 7 days after incubation. The embryos were prepared for analysis using the QuEChERS methodology (an acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, and Safe), followed by analysis through high pressure liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). Analytical validation of the methodology was performed, evaluating linearity, analytical curve residues, limit of detection, limit of quantification, and precision. Regarding the results obtained, atrazine and its metabolites were not detected in embryos at any of the administered concentrations. Mortality and malformation rates were also evaluated, but no significant discrepancies were able to associate the effects of atrazine with deviations from the embryonic developmental pattern. Future studies should be conducted to confirm that bird embryos are incapable of bioaccumulating atrazine and to ensure that the use of this pesticide does not affect the health of animals at the developmental level.

**Keywords:** atrazine, embryo, embryonic development, bioaccumulation, chromatography, analytical validation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da atrazina.....	21
<b>Figura 2.</b> Rotas metabólicas da degradação da atrazina e resíduos de sua decomposição. Os metabólitos são Desetilatrizona (DEA), Desisopropilatrizona (DIA), Hidroxiatrizona (HA), Desetilhidroxiatrizona (DEHA), Dideialquilatrizona (DDA), Desisopropilhidroxiatrizona (DIHA), Amelina e Produtos Hidroxilados Desalquilados (HDAPs).....	23
<b>Figura 3.</b> Gradiente da fase móvel durante a corrida cromatográfica. Eluição por gradiente ACN:Água, vazão 0,4 mL/min, volume de injeção 20 µL.....	40
<b>Figura 4.</b> Cromatograma do comportamento da ATZ, DIA e DEA em solução de 300 µg/L, após o método QuEChERS. Eluição por gradiente ACN:Água, vazão 0,4 mL/min, volume de injeção 20 µL ( $\lambda=221$ nm).....	42
<b>Figura 5.</b> Curva analítica da ATZ (A), DIA (B) E DEA (C) em água ultrapura. Os pontos de concentração das curvas são 25, 50, 75, 100, 150, 250 e 300 µg/L.....	43
<b>Figura 6.</b> Gráficos de dispersão de resíduos de ATZ (A), DIA (B) e DEA (C).....	46
<b>Figura 7.</b> Manipulação dos embriões in ovo até o momento da coleta. Os embriões que estão nos suportes vitais (A) são removidos, limpos e visualizados em lupa (B) para, enfim, serem coletados em tubos falcon, num total de 8 a 12 embriões (C).....	50
<b>Figura 8.</b> Ovo com faixa de sangue, cujo embrião está morto sem causa definida (A). Ovo com sinal de infertilidade (B).....	53
<b>Figura 9.</b> Cromatograma do grupo controle (A) x grupo submetido ao tratamento 1 com ATZ a 500 µg/L (B) .....	54
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas dos grupos controle (A) x grupos sob o tratamento 2 com ATZ a 1000 µg/L (B) .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Tipos de agrotóxicos relacionados com sua função e alvo.....	18
<b>Tabela 2</b> - Tempos de retenção da ATZ, DIA e DEA.....	41
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros de validação analítica do método de análise de ATZ, DIA e DEA utilizando Quechers e HPLC-DAD (n=3).....	44
<b>Tabela 4</b> - Repetibilidade e precisão intermediária para os analitos ATZ, DIA e DEA através de HPLC-DAD (n=3).....	47
<b>Tabela 5</b> - Tipos de injeção e total de amostras resultantes do dia 0 de incubação.....	48
<b>Tabela 6</b> - Dados de coleta dos embriões no dia 7 de incubação para o tratamento 1 utilizando testes para 500 µg/L de atrazina.....	52
<b>Tabela 7</b> - Dados de coleta dos embriões no dia 7 de incubação para o tratamento 2 utilizando testes de 1000 µg/L de atrazina. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>AOAC International</i>
ATZ	Atrazina
C18	Sílica C18
DDA	Didealquilatrazina
DEA	Desetilatrazina
DEHA	Desetilhidroxiatrazina
DIA	Desisopropilatrazina
DIHA	Desisopropilhidroxiatrazina
DPR	Desvio Padrão Relativo
GLY	Glifosato
HA	Hidroxiatrazina
HDPs	Produtos Hidroxilados Desalquilados
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Arranjo de Diodos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássico
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
MSPD	Matriz de Dispersão em Fase Sólida
NaCl	Cloreto de Sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato Dissódico
NBR	Norma Brasileira
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PSA	Amina Primária e Secundária
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UHPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão e Ultra Eficiência
a	Coefficiente Angular
b	Coefficiente Linear
n=	Número de Amostras
s	Desvio Padrão
λ	Comprimento de Onda



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 AGROTÓXICOS.....	21
2.2 CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS.....	22
2.3 ATRAZINA.....	24
2.3.1 Metabólitos da atrazina.....	25
2.3.2 Fatores que influenciam a persistência ambiental da atrazina e de seus metabólitos.....	26
2.4 EFEITOS TÓXICOS DA ATRAZINA EM ORGANISMOS ADULTOS.....	28
2.5 EFEITOS TÓXICOS DA ATRAZINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	29
2.6 BIOACUMULAÇÃO.....	30
2.7 EMBRIÕES DE GALINHA COMO MODELO PARA BIOACUMULAÇÃO.....	31
2.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	32
2.8.1 Preparo de amostra e Método QuEChERS.....	33
2.8.2 Validação Analítica.....	33
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
5.1 OBTENÇÃO DOS OVOS.....	38
5.2 REAGENTES E INSUMOS CROMATOGRÁFICOS.....	38
5.3 TRATAMENTO DOS EMBRIÕES.....	39
5.3.1 Modelo piloto, controles e tratamentos.....	39
5.3.2 Incubação dia 0.....	39
5.3.3 Incubação dia 7.....	40
5.4 ANÁLISE DA ATRAZINA EM EMBRIÕES.....	41

5.4.1 Preparo de amostra.....	41
5.4.2 Validação analítica.....	42
5.4.3 Condições Cromatográficas.....	43
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
6.1 VALIDAÇÃO METODOLÓGICA.....	44
6.2 ANÁLISE DOS EMBRIÕES.....	49
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Toxicologia e a Embriologia são duas grandes áreas interdisciplinares que, quando combinadas, abrem discussões sobre de quais formas o meio externo é capaz de influenciar negativamente o desenvolvimento de um ser vivo. A teratogenicidade é um dos exemplos do porquê associar os estudos em ambas as áreas, pois efeitos ambientais como elementos químicos, fenômenos físicos ou organismos biológicos podem afetar o desenvolvimento embrionário e causar diversos efeitos a longo prazo, tal como a morte em casos extremos.

Na saúde humana, por exemplo, os estudos de abuso de substâncias, novos fármacos, efeitos de radioatividade, patógenos, entre muitos outros, movimentam diversos setores de pesquisa para garantir maior segurança possível durante a gestação materna. Isso se deve aos cuidados adotados sucessivamente à exposição, a prevenção, a proibição, a criação de legislações, e a orientação pública acerca de determinado agente teratogênico.

Sob outro viés, o ambiente não afeta exclusivamente o desenvolvimento humano, visto que a vida animal é intimamente ligada ao meio que está sob seu redor, seja pelo efeito ecológico da fauna e flora, seja pela ação antrópica que influencia diretamente sua integridade. Nesse sentido, a questão ambiental é uma pauta social que deve abordar todas as nuances da interferência humana no reino animal, e justamente no ponto da partida está o desenvolvimento da vida, a embriologia.

As aves são um grande exemplo de como animais vertebrados são afetados com tóxicos do ambiente, uma vez que afetam seus comportamentos e, conseqüentemente, seu papel ecológico. Os impactos antrópicos são nitidamente visualizados em pássaros, e pouco se sabe sobre como isso afeta o desenvolvimento desses animais. Um dos grandes intensivos da indústria agrícola, os agrotóxicos, são relatados em alimentos que muitas vezes se inserem na cadeia alimentar avícola, e os estudos toxicológicos são de suma importância nesse sentido, incluindo o estudo desses efeitos no desenvolvimento embrionário.

Para entender os efeitos, é necessário compreender como o mecanismo de atuação desses produtos afetam o organismo do animal, pois eles já estão inerentes

à exposição. É um papel social pontuar as questões ecológicas, pois vale a ressalva que esses fenômenos relatados também possuem impacto na espécie humana.

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos estudos são necessários para pontuar quais devem ser as possíveis preocupações da comunidade científica que se debruça sobre essa questão dentro das ciências agrárias. Não apenas pela finalidade do estudo, mas também para abrir portas a novos pontos de vista e um melhor direcionamento sobre as problemáticas do uso intensivo de agrotóxicos, tal qual sobre seus efeitos mínimos.

Em suma, a toxicologia envolve assuntos embrionários que correlacionam-se com os mais diversos organismos do planeta. É necessário o incentivo de pesquisas no impactos ambiental dos produtos tóxicos usados em larga escala, incluindo no desenvolvimento embrionário. Estes devem possuir base legítima consolidada para gerar informação de qualidade e abrir espaço para novas indagações sobre o quão segura está a posição de uma espécie frente à natureza.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas no agronegócio com intuito de aumentar a produção agrícola através da proteção e armazenamento dos alimentos (Popp *et al.*, 2012). São definidos pela Lei dos Agrotóxicos nº 7.802/89 como produtos que interagem com organismos prejudiciais à colheita com intuito de modificar algum processo vital de seu desenvolvimento (Brasil, 1989).

A classificação dos agrotóxicos pode ser feita a partir de diversas perspectivas, por exemplo, de acordo com a função e o tipo de praga que combatem, cujo nome está associado diretamente à terminologia da praga-alvo (Yadav & Devi, 2017). A Tabela 1 apresenta uma classificação ampla dos tipos de pesticidas baseados em sua função. Adicionalmente, em razão do risco ou pela funcionalidade, podem ainda ser classificados de acordo com toxicidade, formulações, fontes de origem, mecanismo de ação, forma de aplicação, modo de entrada ou composição química (Yadav & Devi, 2017; Akashe *et al.*, 2018).

**Tabela 1** - Tipos de agrotóxicos relacionados com sua função e alvo.

<b>Tipo de pesticida</b>	<b>Praga alvo / Função</b>
Inseticidas	Mata insetos e outros artrópodes
Fungicidas	Mata fungos (incluindo ferrugem e bolor)
Bactericidas	Mata bactérias ou atua contra bactérias
Herbicidas	Mata ervas daninhas e outras plantas que crescem onde não são desejadas
Acaricidas	Mata ácaros que se alimentam de plantas e animais
Raticidas	Controle de ratos e outros roedores
Algicidas	Controla ou inibe o crescimento de algas
Larvicidas	Inibe o crescimento de larvas
Repelentes	Repele pragas pelo seu sabor ou cheiro
Dessecantes	Atua nas plantas secando seus tecidos

Ovicidas	Inibe o crescimento de ovos de insetos e ácaros
Virucidas	Atua contra vírus
Moluscicidas	Inibe ou mata moluscos
Nematicidas	Mata nematóides que agem como parasitas de plantas
Avicidas	Mata pássaros
Bolas de naftalina	Danifica tecidos de larvas de mariposas ou fungos
Lampricidas	O alvo são larvas de lampreia sem mandíbula
Piscicidas	Atua contra os peixes
Silvicidas	Atua contra vegetação lenhosa
Termiticidas	Mata cupins

---

Fonte: adaptado de Yadav & Devi, 2017.

A utilização dos agrotóxicos é justificada pelo aumento da produtividade de colheitas (Popp *et al.*, 2012), que leva à necessidade de controle de pragas nos campos (Oerke & Dehne, 2004). Entretanto, seu uso está intimamente relacionado com a toxicidade ambiental e humana, resultando em um olhar crítico sobre sua aplicação (Rani *et al.*, 2020).

## 2.2 CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS

Embora historicamente os agrotóxicos tenham contribuído para o aumento da produção agrícola, seu uso excessivo e inadequado pode levar à contaminação do meio ambiente (Jardim *et al.*, 2009). Assim, cadeias ecológicas são prejudicadas e organismos, incluindo humanos, são afetados (Jardim *et al.*, 2009; Lopes & Albuquerque, 2018).

A problemática da contaminação surge devido aos efeitos em alvos não específicos, que, ao estarem expostos ao ambiente contaminado, acabam por sofrer pela intoxicação, como é o caso dos peixes em locais com altas concentrações de agrotóxicos e seus resíduos (Murty *et al.*, 2013). Essa contaminação afeta diversos ecossistemas, visto que os produtos químicos são frequentemente transportados pelo vento e pelas águas da chuva, impactando solos (Andreu & Picó, 2004), rios (Chiarello *et al.*, 2016) e outros tipos de corpos aquáticos essenciais como recursos

naturais (Gama *et al.*, 2013). Amostras de contaminação podem ser encontradas tanto em águas superficiais quanto subterrâneas (Tariq *et al.*, 2007).

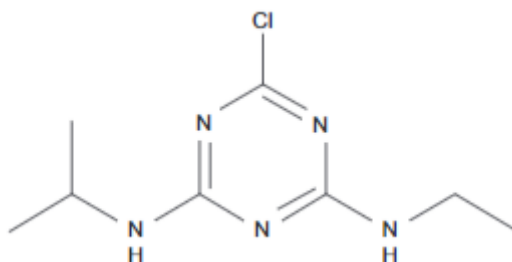
A contaminação é dependente da exposição, que pode ser do tipo aguda, crônica ou subcrônica (Barbosa *et al.*, 2020). Essas exposições ainda são delimitadas pela forma de contato com o humano, uma vez que os químicos podem ser inalados (exposição respiratória), ingeridos (exposição oral) por meio de alimentos contaminados ou água contaminada, e absorvidos pela pele (exposição dérmica) durante o manuseio ou contato direto com produtos contendo agrotóxicos (Hamilton *et al.*, 2004; Macfarlane *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2020; Santacruz-Márquez *et al.*, 2023). Adicionalmente, exposições acidentais são descritas principalmente na exposição ocupacional, sendo casos imprevistos e potencialmente perigosos (García, 2003; Tariq *et al.*, 2007).

Como mencionado, alimentos também sofrem contaminação por agrotóxicos, uma vez que os pesticidas utilizados nas plantações deixam resíduos nos alimentos (Jardim *et al.*, 2009). Devido à forte capacidade de aderência advinda da natureza química dos agrotóxicos, a contaminação de alimentos é preocupante pelo nível de presença e concentração, uma vez que químicos foram encontrados não só em amostras de alimentos contendo adubação convencional como também em alimentos orgânicos (Lima *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2014). Ao nível de distribuição, podem ser encontrados vestígios de pesticidas em alimentos até em setores da cidade não diretamente ligados à produção rural (Caldas *et al.*, 2011).

Por mais que a contaminação ambiental e alimentar devam ser salientadas, também há uma notória preocupação social quanto às comunidades mais diretamente expostas ao uso de agrotóxicos em sua forma massiva, que são os pequenos produtores e comunidades de áreas próximas à produção agrícola, além das comunidades indígenas. A dificuldade de acesso à saúde e a gravidade das intoxicações, que muitas vezes são ignoradas pelos trabalhadores, faz com que esses grupos sejam alheios aos perigos dos agrotóxicos (Castro & Confalonieri, 2005). Adicionalmente, a falta de instrução sobre o manuseio desses químicos faz com que os efeitos negativos dos agrotóxicos sobre a saúde dessas pessoas se intensifique (Veiga *et al.*, 2006). É importante enfatizar ainda que as políticas públicas adotadas por parte da gestão governamental por muitas vezes ignoraram a necessidade de proteção de áreas indígenas, que adoeciam conforme o uso de agrotóxicos se tornava mais intensivo (Gonçalves *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2022).

## 2.3 ATRAZINA

A atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina- 2,4-diamina) é um herbicida sintético do grupo das triazinas, e apresenta cloro em sua composição o que faz com que se encaixe na grande família dos organoclorados (Hansen *et al.*, 2013). A estrutura da atrazina está representada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química da atrazina (Fonte: adaptado de Hansen *et al.*, 2013).

Esse herbicida seletivo é aplicado no solo e absorvido pelas folhas e raízes das plantas, atuando principalmente na inibição da fotossíntese em plantas não desejadas, afetando mecanismos de distribuição de elétrons (Shimabukuro & Swanson, 1969; Hansen *et al.*, 2013). Segundo a literatura, sua utilização ocorre principalmente em culturas de trigo e milho, sendo um dos herbicidas de utilização mais comum devido ao seu longo tempo de mercado e sua ampla gama de usos (Sene *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013; Sadeghnia *et al.*, 2021).

Apesar de ser um herbicida disseminado mundialmente, a atrazina é banida em diversos países, incluindo os países da União Europeia, devido às suas preocupações quanto à degradação do composto e sua capacidade de contaminação ambiental (Sass & Colangelo, 2006; Hansen *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos, a atrazina continua sendo utilizada (Williams *et al.*, 2011), mas seu limite em água potável foi estabelecido em 3 µg/L (Hansen *et al.*, 2013). Outros países, inclusive a União Européia, também definiram valores máximos da atrazina em água potável mesmo após a proibição, uma vez que este composto ainda é encontrado em amostras de água superficiais (Sass & Colangelo, 2006).



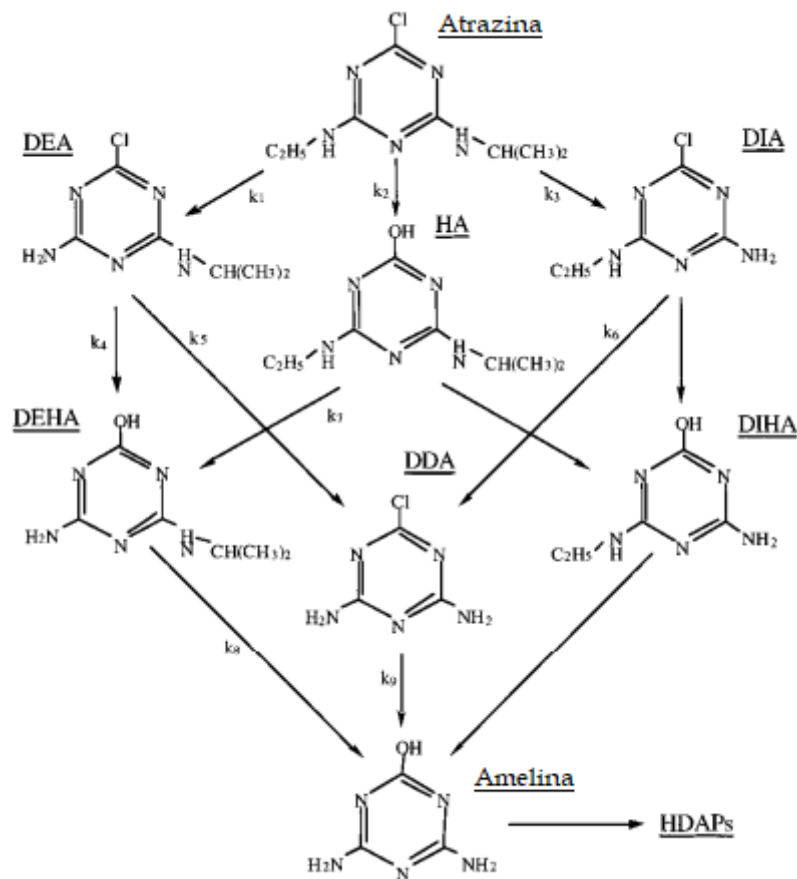
Por outro lado, mesmo que o Brasil também tenha legislação sobre o valor máximo da concentração de atrazina por litro de água potável, seu uso é muito mais difundido e indiscriminado (Lima *et al.*, 2018). Para via de comparação, o limite da legislação europeia é de 0,1 µg/L de atrazina em água potável, enquanto no Brasil esse valor é 2 µg/L, um valor 20 vezes maior (Freitas & Regino, 2020). O Brasil é um dos maiores produtores de milho (Resende *et al.*, 2019), e sendo a União Europeia um dos principais mercados de exportação do Brasil (Megiato *et al.*, 2016), as preocupações recaem sobre a utilização do herbicida nas plantações, especialmente com o milho, visto que é matéria-prima para fabricação de ração (Mallmann *et al.*, 2019). Portanto, os resíduos da atrazina podem entrar na cadeia alimentar de animais e acabar em carnes, leite e derivados, ovos, entre outros (Hong *et al.*, 2022).

### 2.3.1 Metabólitos da atrazina

Os herbicidas podem sofrer decomposição, através de processos bióticos ou abióticos, após serem utilizados (Rostami *et al.*, 2021). A decomposição gera compostos secundários, conhecidos como resíduos ou metabólitos, que majoritariamente são menos tóxicos para a fauna e flora do que o composto primário, mas em alguns casos podem ser ainda mais tóxicos (Sinclair & Boxall, 2003). A atrazina apresenta notável persistência no meio ambiente gerada pela degradação biótica e abiótica, o que torna-se um problema ecológico quando resíduos dessa substância são encontrados em riachos, bacias hidrográficas e outros corpos de água, seja em águas superficiais ou subterrâneas (Solomon *et al.*, 1996; Kumar & Singh, 2016).

A decomposição da atrazina gera diversos metabólitos, mostrados na Figura 2, e, apesar das vias de degradação da atrazina ainda não serem completamente definidas, as rotas mais relatadas envolvem a hidrólise, desalquilação, descloração e desaminação da atrazina (Burken & Schnoor, 1997; Ghosh & Philip, 2006; Barr *et al.*, 2007; Rostami *et al.*, 2021). A N-desalquilação da atrazina forma seus dois principais metabólitos, a deetilatraxina (DEA) e a deisopropilatraxina (DIA), que, além de serem encontrados facilmente em águas superficiais (Thurman *et al.*, 1994), podem ainda reagir com mais compostos e gerar outros metabólitos derivados, estando, portanto, biologicamente ativos na natureza (Barr *et al.*, 2007).

Adicionalmente, esses metabólitos têm a capacidade de lixiviar da superfície do solo e penetrar a superfície, sendo assim encontrados também em águas subterrâneas (Nasseri *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Rotas metabólicas da degradação da atrazina e resíduos de sua decomposição. Os metabólitos são Desetilatrizona (DEA), Desisopropilatrizona (DIA), Hidroxiatrizona (HA), Desetilhidroxiatrizona (DEHA), Dideilatrizona (DDA), Desisopropilhidroxiatrizona (DIHA), Amelina e Produtos Hidroxilados Desalquilados (HDAPs) (Fonte: adaptado de Burken & Schnoor, 1997).

### 2.3.2 Fatores que influenciam a persistência ambiental da atrazina e de seus metabólitos

A atrazina apresenta diversas características que explicam sua alta persistência ambiental em corpos de água e solo, estando relacionado principalmente aos fenômenos de biodegradabilidade e biodisponibilidade (Jablonowski *et al.*, 2010). A biodisponibilidade está associada à adsorção da atrazina ou dos metabólitos pelas características da matriz do solo, enquanto a

biodegradabilidade sofre influência da transformação da atrazina nos metabólitos secundários (Besse-Hoggan *et al.*, 2009).

Dentre os fatores que influenciam no processo de adsorção, as propriedades do solo e do ambiente apontam que a presença de atrazina adsorvida diminui sua disponibilidade para participar de processos dissipativos, como a biodegradação (Jablonowski *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2013). Nesse sentido, as primeiras propriedades que estão relacionadas à persistência da atrazina são estrutura, tamanho e composição do solo, em que diferentes tipos rochosos determinam diferentes quantidades de escoamento dos químicos, estando relacionados principalmente com a superfície de contato entre o sedimento e o agrotóxico (Wang & Keller, 2009). Outras composições do solo que também afetam as propriedades da adsorção da atrazina ou dos metabólitos são: o pH (Houot *et al.*, 2000), a presença prévia de atrazina ou de outros pesticidas em suas respectivas quantidades (Barriuso & Houot 1996; Zablotowicz *et al.*, 2008), o conteúdo de carbono orgânico e compostos nitrogenados (Alvey & Crowley, 1995; Ahmad & Rahman, 2009), a salinidade (Lin *et al.*, 2008) e as condições de umidade (Kruger *et al.*, 1993).

Na sequência, a biodegradabilidade é estudada para recuperar ambientes contaminados pela atrazina (Fang *et al.*, 2015). Esse é um processo relativamente complexo, uma vez que o comportamento dos agrotóxicos é impreciso dadas as interações bióticas e abióticas do seu entorno (Kah *et al.*, 2007), mas, em poucas palavras, a degradação da atrazina ocorre através de reações biológicas e/ou químicas (Erickson *et al.*, 1989; Rostami *et al.*, 2021). As reações biológicas envolvem comunidades de microrganismos, que variam seu rendimento de degradação de acordo com as espécies e suas interações com as condições do solo (Rousseaux *et al.*, 2001). A existência dos microrganismos metabolizadores por si é um indicativo de que existem diversas influências na degradação da atrazina por diversos parâmetros, sendo um exemplo o uso de fertilizantes no solo, que podem conter antibióticos em sua formulação afetando diretamente a comunidade microbiana (Jiang *et al.*, 2021). Por outro lado, as reações químicas envolvem processos eletrocinéticos, fotólise, fenton e entre outros, cujos interferentes dependem da reação (Rostami *et al.*, 2021). Exemplificando, compostos nitrogenados e compostos férricos são capazes de afetar a velocidade da reação da fotólise (Burrows *et al.*, 2002).

Os dois fenômenos descritos definem o potencial da aderência da atrazina no ambiente (Jablonowski *et al.*, 2010). Eles podem explicar porque ainda são encontradas concentrações de atrazina em amostras de águas em países que proibiram seu uso há anos (Vonberg *et al.*, 2014). Ademais, a atrazina e seus metabólitos possuem uma meia-vida maior em baixas temperaturas, ou seja, a degradação do químico ocorre de forma mais lenta no fundo da água, explicando sua existência em águas subterrâneas (Kruger *et al.*, 1993; Vonberg *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2021).

Adicionalmente, fatores climáticos, como temperatura e precipitação pluvial, auxiliam o escoamento superficial de águas contaminadas (Carmo *et al.*, 2013), podendo levar a atrazina e seus metabólitos à corpos d'água, incluindo água potável, causando intoxicação à organismos vivos (Pathak & Dikshit, 2012; Inoue-Choi *et al.*, 2016).

#### 2.4 EFEITOS TÓXICOS DA ATRAZINA EM ORGANISMOS ADULTOS

Estudos relatam que a atrazina apresenta efeitos ambientais em plantas não-alvo e na fauna aquática ao estar em contato direto com organismos desses meios (Singh *et al.*, 2017). Adicionalmente, diversos estudos de toxicidade avaliam os efeitos da atrazina em mamíferos e aves adultas (Donna *et al.*, 1986; Kornilovskaya *et al.*, 1996; Wilhelms *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2011), apesar dessas espécies não apresentarem uma taxa de exposição direta significativa, mas a exposição ainda pode ocorrer principalmente pela ingestão de produtos contaminados, ou seja, água e alimentos (Smith *et al.*, 2021).

A desregulação endócrina é uma das preocupações principais relacionadas à atrazina, visto que modificações hormonais comprometem o sistema reprodutivo (Sanderson *et al.*, 2002). Primeiramente, a atrazina desmasculiniza as gônadas masculinas de todas as classes de vertebrados superiores (Solomon *et al.*, 2008; Rohr & McCoy, 2010), com exceção das aves (Wilhelms *et al.*, 2016), ao alterar tamanho, número e produção das células, hormônios e estruturas do trato reprodutivo masculino (Hayes *et al.*, 2011). Ensaio em ratos e camundongos indicaram influência da atrazina em estruturas testiculares, como irregularidades em células de Leydig, degeneração de células de Sertoli e atrofia testicular, o que prejudica a mobilidade e número significativo de espermatozoides desses animais

(Kniewald *et al.*, 2000; Victor-Costa *et al.*, 2010). A modificação das estruturas testiculares influencia as vias de secreção de hormônios pré-armazenados ou pré-sintetizados (Kucka *et al.*, 2012). As fêmeas também apresentam desregulação endócrina de seus sistemas reprodutores (Cooper *et al.*, 1996; Wirbisky & Freeman, 2015); por exemplo, a atrazina é capaz de alterar os níveis do hormônio luteinizante (LH) através de ação no hipotálamo em ratos (Cooper, 2000) e afetar a maturação do oócito suíno (Yuan *et al.*, 2017).

A toxicidade da atrazina afeta outros órgãos essenciais, como o sistema nervoso central, onde apresenta neurotoxicidade no hipocampo e nas vias dopaminérgicas, afetando padrões comportamentais, de aprendizagem e de memória (Bardullas *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019). O estômago e o fígado também são afetados pela atrazina por conta da exposição oral e metabolização, respectivamente, da atrazina por esses órgãos, onde há degradação das células que revestem esses tecidos (Olejnik *et al.*, 2010; Campos-Pereira *et al.*, 2012). Efeitos de toxicidade crônica, genotoxicidade e oncogenicidade também são descritos pela literatura (Gammon *et al.*, 2005), porém suas bases são conflitantes e ainda carecem de mais estudos.

## 2.5 EFEITOS TÓXICOS DA ATRAZINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Muitos agrotóxicos, como fungicidas, já demonstraram seus efeitos tóxicos no desenvolvimento embrionário (Arcain *et al.*, 2021). Existem trabalhos publicados sobre os efeitos embriotóxicos da atrazina principalmente com organismos marinhos, como moluscos, crustáceos e peixes, o que indica a necessidade de maiores estudos em mamíferos e aves (Blahova *et al.*, 2020).

Os estudos embriotóxicos apresentados em caramujos demonstraram que altas concentrações de atrazina induziram dificuldades na eclosão desses animais (Sawasdee & Kohler, 2009). Estudos conduzidos em moluscos demonstraram que apesar da atrazina desenvolver anormalidades embrionárias, o agrotóxico não influencia no seu tempo de desenvolvimento (Palma *et al.*, 2009).

Em peixes, a intoxicação ocorre porque o córion de ovas de peixes não consegue impedir a contaminação aguda por atrazina (Blahova *et al.*, 2020). Estudos no modelo peixe-zebra (*Danio rerio*) mostraram que a atrazina em baixas

concentrações é capaz de perturbar o estágio de desenvolvimento embrionário, e em concentrações um pouco mais altas, causar problemas na organogênese e distúrbios em órgãos do animal (Wiegand *et al.*, 2001). Porém, um estudo com o mesmo organismo modelo mostrou que apenas em altíssimas concentrações de atrazina ou de seus metabólitos, normalmente não presentes significantes na natureza, houve efeitos embriotóxicos (Blahova *et al.*, 2020).

Estudos de casos em humanos também foram conduzidos para avaliar a toxicidade embrionária da atrazina, especialmente em gestantes de uma população que consumia água contaminada por atrazina. Apesar de alguns bebês terem nascido fora dos padrões de normalidade, os resultados não puderam ser diretamente associados com a ação da atrazina (Villanueva *et al.*, 2005).

Em aves, a atrazina foi associada com o atraso da eclosão dos pássaros e também como desregulador endócrino (Ottinger *et al.*, 2006).

## 2.6 BIOACUMULAÇÃO

A bioacumulação é o processo no qual um organismo possui uma taxa de absorção de determinada substância maior do que o seu corpo é capaz de eliminar (Kehrig *et al.*, 2011). A bioacumulação ocorre a partir da captação do elemento através de um processo gradual, fazendo com que o organismo concentre a substância de acumulações anteriores (Streit, 1992). A bioacumulação depende de alguns fatores físicos-químicos em compostos orgânicos, como a lipofilicidade, baixa solubilidade em água, baixa degradabilidade, baixo grau de ionização e pequeno tamanho molecular (Streit, 1992; Tyohemba *et al.*, 2021). Sabe-se que a atrazina tem a capacidade de se acumular em peixes (Preez & Vuren, 1992) e plantas (Pérez *et al.*, 2022), desse modo os animais terrestres podem ser afetados através da ingestão de alimentos contaminados (Solomon *et al.*, 2008).

Nos peixes, a acumulação ocorre de maneira rápida através das guelras ou da pele, sendo encontrados traços do agrotóxico em órgãos com alta circulação sanguínea, como fígado, cérebro e intestino, e na musculatura do animal (Gunkel *et al.*, 1980; Streit, 1992). Adicionalmente, concentrações encontradas na musculatura do peixe são significativamente maiores do que as observadas na água contaminada, o que corrobora o fenômeno de bioacumulação (Streit, 1992).

Em aves, a alimentação está diretamente relacionada com a capacidade de acumulação em seus tecidos, visto que a concentração dos tóxicos nesses animais variam de acordo com a dieta dos peixes aos quais estão expostos (Falkowska & Reindl, 2015). A atrazina mostrou ser capaz de bioacumular-se nos músculos e fígados de gaivotas predatórias, uma vez que os peixes ingeridos também estão contaminados (Reindl *et al.*, 2015). A hepatotoxicidade ocorre devido a danos oxidativos e fatores pró-apoptóticos, relacionadas com as vias de sinalização alteradas devido à presença de atrazina (Zhang *et al.*, 2017). Entretanto, a falta de literatura dificulta a avaliação da bioacumulação em aves, principalmente aos efeitos embriotóxicos, indicando a importância do presente estudo.

## 2.7 EMBRIÕES DE GALINHA COMO MODELO PARA BIOACUMULAÇÃO

Ovos de galinha doméstica (*Gallus gallus*) têm sido amplamente utilizados como organismos modelo na pesquisa básica devido às suas características muito bem estabelecidas, envolvendo uma variedade de técnicas e pesquisas para a embriologia (Vilches-Moure, 2019). Cerca de 60% do genoma da galinha é ortólogo ao genoma humano, sendo também condensado em cromatina e heterocromatina, o que traça um ótimo paralelo entre as duas espécies em estudos epigenômicos (Beacon & Davie, 2021).

Os embriões de galinha podem ser usados para estudar de quais formas diferentes condições físicas, como temperatura e oxigênio do ambiente, afetam o desenvolvimento embrionário (Chan & Burggren, 2005; Hammond *et al.*, 2007). Interações e mecanismos biológicos também são explorados, tal como efeitos de hormônios sobre o desenvolvimento ou ensaios de observação de órgãos afetados por algum fator externo (Eriksen *et al.*, 2003; Vilches-Moure, 2019).

Bioensaios de toxicidade também são amplamente utilizados com ovos de galinha, incluindo ensaios de intoxicação por metais pesados (Bojarski *et al.*, 2022), nanomateriais (Scalisi *et al.*, 2020), toxinas de animais (Jiao *et al.*, 2021) ou toxinas de microrganismos (Bryla *et al.*, 2023). Não obstante, os agrotóxicos não fogem da lista de químicos que utilizam embriões de galinha para estudos toxicológicos (Fry *et al.*, 1995; Arcain *et al.*, 2021). Contudo, embora tanto outros agrotóxicos quanto a atrazina já tenham demonstrado efeitos negativos no desenvolvimento embrionário da galinha doméstica (Matsushita *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2021), pouco se sabe

sobre a bioacumulação de atrazina neste modelo, indicando a necessidade do desenvolvimento de um protocolo para futuras pesquisas.

## 2.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A cromatografia é um método de separação que utiliza duas fases, uma móvel e uma estacionária, para separar as moléculas de uma mistura (Coskun, 2016). As moléculas da solução são aplicadas em uma superfície ou sólido, e a fase estacionária ajuda a separá-las enquanto se movem com a fase móvel (Anderson & Armstrong, 2003). Esse processo depende de características moleculares, como adsorção, partição e diferenças de afinidade ou pesos moleculares (Cuatrecasas *et al.*, 1968). As características moleculares definem um tempo de passagem diferente pelo equipamento cromatográfico, que é capaz de quantificar a passagem e separação dos componentes (Hage, 2018).

A cromatografia pode ser classificada de acordo com o tipo de suporte da fase estacionária ou baseada no método empregado pela fase móvel, assim, os tipos de cromatografia são: cromatografia em coluna, cromatografia de troca iônica, cromatografia de permeação em gel, cromatografia de afinidade, cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa, cromatografia de corante-ligante, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de pseudoafinidade e cromatografia líquida de alta pressão (Coskun, 2016; Hage 2018).

Dentre esses, a cromatografia líquida (LC) é amplamente utilizada para a detecção de multiresíduos de herbicidas (Niell *et al.*, 2010; Carlos *et al.*, 2015; Poiger *et al.*, 2016). Dessa forma, dentre os diversos tipos de cromatografia líquida, as que mais se destacam em estudos envolvendo herbicidas são a cromatografia líquida em alta pressão (HPLC) e cromatografia líquida em alta pressão e ultra eficiência (UHPLC) (Hollaway *et al.*, 1999; Saraji & Tansazan, 2009; Zhong *et al.*, 2012; Safari *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015).

Assim, em herbicidas triazínicos, a cromatografia é utilizada com diferentes detectores para analisar multiresíduos dos agrotóxicos em diferentes tipos de amostras (Abbas *et al.*, 2014). A escolha do detector para otimizar a metodologia depende de fatores como a sensibilidade, o tempo de resposta, o volume de detecção e a operação do aparelho, de forma que busquem aumentar a precisão



analítica da composição da mistura e diminuem as interferências do manipulador (McWilliam *et al.*, 1959).

### 2.8.1 Preparo de amostra e Método QuEChERS

Anteriormente à cromatografia, uma etapa fundamental para garantir a precisão da análise é a preparação de amostra, pois esta tem finalidade de isolar e concentrar o analito de interesse, tal como purificar a amostra para impedir a contaminação da análise por interferentes (Nováková & Vlcková, 2009). Dentre os vários métodos de preparação de amostra, o método QuEChERS ('Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe') se destaca pela sua eficiência na análise de metabólitos de agrotóxicos e também é adequado para ensaios de cromatografia (Meira, 2015). O método QuEChERS funciona combinando a extração líquido-líquido com a dispersão de sais para purificar e concentrar resíduos de pesticidas em amostras de alimentos, podendo ser adaptado para outras metodologias (González-Curbelo *et al.*, 2015). Embora estudos envolvendo o método QuEChERS tenham sido conduzido em galinhas (Lian *et al.*, 2014) e em embriões (Kurt *et al.*, 2017), as informações de embriotoxicidade envolvendo o modelo embrionário de *Gallus gallus* ainda são limitadas.

### 2.8.2 Validação Analítica

Quando novos métodos analíticos são desenvolvidos ou implementados pela primeira vez em laboratório, é exigido da abordagem um nível de confiança baseado em critérios técnicos para justificar a qualidade de seus processos (Valentini *et al.*, 2022). Dessa forma, a necessidade de métodos validados asseguram a confiança das práticas cromatográficas, sendo realizada em diversas análises biológicas nesta área (Peris-Vicente *et al.*, 2022; Thoueille *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023).

A nível nacional, o Ministério da Saúde em conjunto com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem a Resolução da Diretoria Colegiada número 166 (RDC nº166), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (Brasil, 2017). Além destes, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), através da norma instituída pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT) NBR ISO/IEC 17025/2017, fornece o

documento orientativo DOQ-CGCRE-008, cujo objetivo é orientar laboratórios de ensaio na validação de métodos analíticos para garantir resultados de qualidade (INMETRO, 2020).

Por outro lado, a nível internacional, a Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC International), é uma entidade governamental cujo propósito é desenvolver métodos oficiais adotados por agências reguladoras para análises de alimentos, medicamentos e substâncias perigosas, garantindo confiabilidade analítica para promover segurança (Baur & Ensminger, 1977). As atuais diretrizes fornecidas pela AOAC estão em seu livro *Official Methods of Analysis*, que fornece padrões e métodos reconhecidos internacionalmente para análise de produtos químicos (AOAC, 2023).

Dando sequência, a validação ocorre através de uma série de requisitos nomeados desempenhos analíticos, que são avaliados em: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (Ribani *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007; Araujo, 2009; Brasil, 2017; INMETRO, 2020).

A seletividade em métodos instrumentais de separação refere-se à capacidade de distinguir inequivocamente as substâncias de interesse em amostras complexas, assegurando que o pico de resposta seja exclusivamente atribuído ao composto desejado (Persson & Vessman, 2001). Este critério essencial no desenvolvimento e validação de métodos deve ser continuamente reavaliado durante a análise, podendo ser verificado por meio de comparação entre matrizes isentas e adicionadas da substância de interesse do estudo, ou pelo uso de detectores modernos que comparam o espectro do pico obtido com o de um padrão (Verbic *et al.*, 2013).

A linearidade em métodos analíticos refere-se à capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada em uma faixa específica, estabelecendo uma correlação entre o sinal medido e a concentração (Epshtein, 2019). Assim, para garantir a precisão e minimizar erros, são necessários cinco pontos, excluindo o zero, para a construção da curva analítica (Araujo, 2009). A regressão linear é utilizada para estimar os coeficientes da curva, incluindo os parâmetros  $a$  e  $b$ , e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Shrivastava & Gupta, 2022). Este último, com um valor próximo de 1, indica menor dispersão nos dados experimentais, desse modo servindo como indicador da qualidade da curva (Araujo, 2009; Shrivastava & Gupta, 2022). Além disso, a

ANVISA define que o coeficiente de correlação deve ser no mínimo 0,99 (Brasil, 2017).

Por fim, o limite de detecção (LD) representa a menor concentração de uma substância que pode ser detectada, embora não quantificada pelo instrumento, enquanto o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com confiabilidade (INMETRO, 2020). Ambos os métodos podem ser estimados a partir de diferentes formas, seja através de ajustes experimentais por meio de diluições seriadas, seja por meio de estimativas instrumentais, utilizando equações matemáticas para determinar os menores valores possíveis (Álvaro-Alonso *et al.*, 2022). Ressaltando, a ANVISA sugere uma relação entre os limites e o branco, ou o menor ponto de concentração da curva analítica, de 10:1 para detecção e 3,3:1 para quantificação (Brasil, 2017).

A precisão avalia a dispersão de resultados em condições específicas, podendo ser medida pelo desvio padrão absoluto, intervalo de confiança da média ou desvio padrão relativo (DPR), a depender do número de medições (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2020). Na validação de métodos, a precisão é considerada em três níveis: repetitividade (concordância em medições sucessivas sob as mesmas condições), precisão intermediária (variações dentro do laboratório) e reprodutibilidade (concordância entre medições em condições variadas, como diferentes laboratórios) (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2020). A ANVISA sugere critérios específicos para a verificação da repetitividade e da precisão intermediária, como um mínimo de nove determinações sobre a faixa de concentrações da curva analítica, em pontos mínimos, médios e altos (Brasil, 2017).

A exatidão em validação de métodos analíticos refere-se à proximidade entre os resultados obtidos por um método analítico e o valor verdadeiro ou aceito como referência (Araujo, 2009). Em outras palavras, a exatidão mede o quão próximo o resultado do método está do valor teórico ou verdadeiro da amostra analisada (Ribani *et al.*, 2004).

### 3 JUSTIFICATIVA

A atrazina é um herbicida que possui uma capacidade de bioacumulação em diferentes tipos de espécies, podendo ser encontradas em plantas e peixes, componentes de base na cadeia alimentar, que são bastante consumidos por animais predadores de topo da cadeia, inclusive os humanos. Dessa forma, a atrazina tem o potencial para se bioacumular em órgãos e tecidos, causando uma preocupação no ambiente e na saúde sobre os potenciais riscos tóxicos desse agrotóxico.

Os embriões de galinha vem sendo utilizados em vários estudos e gerando bons resultados como organismo modelo em avaliações embriotoxicológicas. Portanto, devido ao fato da ausência completa de informações descritivas sobre os efeitos de bioacumulação da atrazina em embriões de galinha, o presente trabalho se propõe a criar um modelo de protocolo para avaliação da bioacumulação de atrazina em embriões de *Gallus gallus* através da metodologia de preparo de amostra QuEChERS e análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detector de arranjos (DAD).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um protocolo para análise de bioacumulação da Atrazina e seus metabólitos DIA e DEA por cromatografia em embriões de galinha (*Gallus gallus*).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o tratamento de ovos de galinha fertilizados com atrazina, através de injeção na câmara de ar;
- Coletar embriões previamente tratados com atrazina, e prepará-los para as análises posteriores;
- Otimizar metodologia para extração e preparo das amostras usando QuEChERS;
- Realizar análises cromatográficas das amostras biológicas preparadas a partir dos embriões de galinha tratados com atrazina;
- Validar a metodologia analítica de preparo e análise de atrazina e seus principais metabólitos utilizando HPLC-DAD;
- Verificar taxas de mortalidade, malformações e análises cromatográficas para definir se a absorção da atrazina pode ser relacionada com a atrazina.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 OBTENÇÃO DOS OVOS

Os ovos foram obtidos por um comerciante orgânico local de Foz do Iguaçu, Paraná, entre os meses de julho e setembro de 2023. No total foram obtidas 12 dúzias (n=144) de ovos de galinha (*Gallus gallus*), distribuídos entre grupos de dúzias para: 1 modelo piloto; 4 tratamentos e 4 controles, para a concentração de 500 µg/L; e 2 tratamentos e 1 controle, na concentração de 1000 µg/L.

### 5.2 REAGENTES E INSUMOS CROMATOGRÁFICOS

Os padrões analíticos utilizados neste experimento foram obtidos da Sigma-Aldrich e apresentaram pureza de: ATZ (CAS: 1912-24-9) 99,1%, DIA (CAS: 1007-28-9) 97,5% e DEA (CAS: 6190-65-4) 99,5%.

A acetoneitrila utilizada como solvente foi de grau HPLC (99,9%, CAS: 75-05-8) adquirido da Sigma Aldrich.

A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação de água Elga (Purelab Option – Q), com resistividade de 18,2 MΩ cm.

Os sais utilizados para o preparo de amostra foram de grau analítico. O sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) (CAS: 7487-88-9) foi obtido da Êxodo Científica, o cloreto de sódio (NaCl) (CAS: 7647-14-5) foi obtido da Dinâmica, C18 foi obtida da Sigma Aldrich, e o PSA foi obtido da Supelco .

Já os sais utilizados para o preparo do tampão fosfato-salino (PBS) foram cloreto de sódio (NaCl) (CAS: 7647-14-5) foi obtido da Neon, cloreto de potássio (KCl) (CAS: 7447-40-7) da Sigma Aldrich, fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (CAS: 7778-77-0) Sigma Aldrich e fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (CAS: 7558-79-4) da Sigma Aldrich.

A solução dos padrões analíticos foram preparados, individualmente, na concentração de 1000 mg/L em acetoneitrila. Para tal, pesou-se 0,10 g de ATZ, DIA e DEA e diluiu-se em balão volumétrico de 100 mL, sendo aferido o volume com acetoneitrila. A partir disso, as soluções de trabalho foram preparadas em conjunto e realizadas a partir da diluição desta solução em água ultrapura para obterem-se as soluções de ATZ, DIA e DEA a 500 e 1000 µg/L.

A solução PBS tamponada foi preparada de forma concentrada: 1,37 mol/L de NaCl, 27 mmol/L de KCl, 100 mmol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 18 mmol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Deste modo, pesou-se 17,80 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,40 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80,00 g de NaCl e 2,00 g de KCl e diluiu-se em proveta de 1000 mL, sendo aferido o volume com água destilada autoclavada. Esta foi a solução estoque, a solução trabalho utilizada em todo o procedimento foi feita a partir da diluição do PBS em água destilada autoclavada na proporção de 1:10.

### 5.3 TRATAMENTO DOS EMBRIÕES

#### 5.3.1 Modelo piloto, controles e tratamentos

O modelo piloto teve como finalidade aprender as técnicas iniciais do protocolo a ser desenvolvido. Ocorreu seu aproveitamento máximo, prevendo quais os possíveis comportamentos dos embriões frente aos primeiros testes.

O controle foi realizado injetando-se água destilada autoclavada no ovo para simular as condições de volume do tratamento com atrazina. O processo consistiu na incubação do ovo no dia 0 com água destilada, retirada do embrião no 7º dia e congelamento dessa amostra até o estágio de preparo para análise cromatográfica.

Para o tratamento, utilizou-se este mesmo processo, contudo a solução de ATZ 500 ou 1000 µg/L foi administrada no lugar de água destilada. A solução de 500 µg/L correspondeu ao tratamento 1, enquanto a solução de 1000 µg/L correspondeu ao tratamento 2.

#### 5.3.2 Incubação dia 0

No dia 0 de incubação foi realizada a injeção no modelo animal, seja o controle (água) ou o tratamento (ATZ). O procedimento consistiu primeiramente na limpeza superficial da casca do ovo com álcool 70% e verificação de rachaduras, sendo que o ovo foi deixado na posição horizontal e marcado na parte superior para sinalizar sua orientação espacial. A partir disso, os ovos foram pesados em balança analítica (EVEN) individualmente, para que a injeção pudesse seguir a proporção de 1 µL/g de ovo. Considerando a massa dos ovos (41,37 - 65,52 g), esta proporção variou de 41,37 a 65,52 µL/g.

Em seguida, o experimento seguiu para a capela exaustora de gases (Spencer equipamentos), onde foi feito um furo pequeno na câmara de ar do ovo, com auxílio de uma tesoura. Nesse local, de acordo com a proporção indicada, pipetou-se água, solução de ATZ 500 µg/L ou solução de ATZ 1000 µg/L. Assim, os ovos foram selados com cola quente e direcionados para a incubadora (Chocadeiras Pantanal) na posição vertical, com câmara de ar para cima por 2 horas, sem agitação. Logo após, foram reposicionados na horizontal, onde a incubação acontecia por 7 dias em rolagem automática. As condições de umidade e temperatura foram constantes na incubadora durante todo o período, a temperatura sendo de  $37,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3.3 Incubação dia 7

No dia 7 de incubação foi realizada a extração ou coleta dos embriões. O início da coleta consistiu na retirada dos ovos da incubadora e posicioná-los na horizontal, para atingirem temperatura ambiente. Um pano umedecido foi colocado sobre os ovos para evitar desidratação. Os ovos foram coletados um a um para serem secos, cobertos por uma fita isolante transparente e levados para capela exaustora de gases.

Na sequência, o procedimento contou com um novo furo na região da câmara de ar, e, com seringa, foi retirada uma quantidade de 5 mL de líquido interno para diminuir o volume do ovo e afastar o embrião da casca. Dessa forma, com a tesoura e o ovo posicionado na horizontal, uma janela foi aberta no topo do ovo para expor o embrião, que a primeiro momento foi analisado para mortalidade. Ovos não fertilizados foram desconsiderados das análises.

O passo seguinte foi a coleta do embrião. Com tesoura e colher, separou-se o embrião dos vasos sanguíneos e transferiu-se para uma placa de petri contendo PBS. Essa placa foi transferida para ser analisada em lupa (Zeiss), onde além de se verificar as malformações, também foi retirado as membranas extraembrionárias.

Por fim, ainda em lupa, foi realizado o estadiamento do embrião segundo Hamburger e Hamilton (1951) e novamente a pesagem em balança analítica. A cada grupo de 12 ovos, os embriões presentes foram coletados em tubos falcon de 50 mL e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



## 5.4 ANÁLISE DA ATRAZINA EM EMBRIÕES

### 5.4.1 Preparo de amostra

O preparo das amostras de embriões seguiu a metodologia QuEChERS adaptada de Anastassiades *et al.* (2003). Os tubos falcon contendo os embriões foram retirados do freezer e ambientados para atingirem uma temperatura local. Seus volumes foram dependentes do número de coletas de embriões nos 12 ovos, variando de 8 a 12 indivíduos e, aproximadamente, 10 a 15 mL. A partir disso, os embriões foram homogeneizados em 10 mL de acetonitrila e triturados no ultra turrax (IKA ®) por 40 segundos.

Na seguinte etapa, denominada de *salt out*, ou extração sólido-líquido (SPE), adicionou-se 4,00 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) anidro e 1,00 g de cloreto de sódio (NaCl) no tubo falcon contendo as amostras, que imediatamente foram levados a vórtex (Phoenix Luferco) por 1 minuto e direcionados à centrifuga (Hettich Zentrifugen), por 15 minutos em 4.000 RPMs.

A etapa seguinte foi a de extração líquido-líquido (LLE), em que 2000 µL da fase orgânica geradas pela decantação foi transferida para um tubo falcon novo de 15 mL contendo 300 mg de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) anidro, 100 mg de C18 e 50 mg de PSA. O tubo de ensaio novamente foi submetido a vórtex e centrifugado nas mesmas condições descritas na SPE.

A etapa final foi coletar 1000 µL da fase líquida gerada pela decantação e transferir para um vial de 5 mL. A solução contendo atrazina foi filtrada em filtro PTFE hidrofílico de membrana 0,22 µm. Os vials contendo as amostras foram mantidos em freezer (-20°C) até o momento da injeção no aparelho, onde ocorreu a análise cromatográfica.

O método QuEChERS também foi aplicado na construção da curva analítica em água ultrapura. A metodologia se conduziu da mesma forma, porém no lugar dos embriões, foram adicionadas 5 mL de concentrações variáveis e crescentes de ATZ, DIA e DEA diluídas em água ultrapura.

#### 5.4.2 Validação analítica

Para a validação analítica, os parâmetros avaliados foram: linearidade, resíduos, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) (Ribeiro *et al.*, 2008; INMETRO, 2020).

Foram preparadas soluções de ATZ, DIA e DEA nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 150, 250 e 300 µg/L. Essas soluções foram preparadas através da diluição de 125, 250, 375, 500, 750, 1250 e 1500 µL, respectivamente, das soluções de ATZ, DIA e DEA (1000 µg/L) em água ultrapura em um balão volumétrico de 5 mL. As curvas analíticas foram preparadas em triplicata.

A linearidade foi estabelecida através da planilha do Ribeiro *et al.* (2008), que realiza o teste linear através da comparação dos resíduos do ajuste linear e do ajuste quadrático, utilizando-se de um teste-F de significância. Também foi avaliada segundo o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) pelo Excel Microsoft.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados através do método simplificado nas Equações (1) e (2), segundo o INMETRO.

$$LD = 3,3 s / b \quad (1)$$

$$LQ = 10 s / b \quad (2)$$

$s$  = desvio padrão da resposta do branco, e, quando o branco não gera sinal, pode-se adotar o valor do desvio padrão do menor nível da curva analítica.

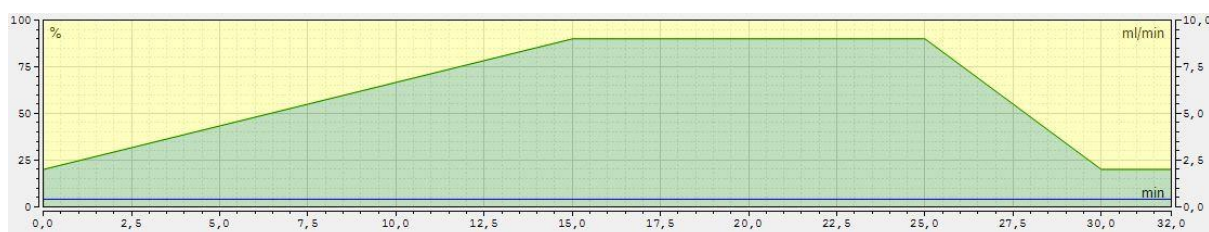
$b$  = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

A precisão foi estimada a partir do desvio padrão relativo (DPR) para análises de amostras contendo as mesmas quantidades das concentrações deferidas, referente à planilha de Ribeiro *et al.* (2008). Dessa forma, foram avaliadas através do preparo de triplicatas independentes em níveis baixo, médio, e altos, cujas concentrações foram 25, 100 e 300 µg/L para ATZ e DEA, e 50, 150 e 300 µg/L para DIA.

### 5.4.3 Condições Cromatográficas

As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Thermo Fisher Scientific), com bomba (LGP-3400SD), injetor (WSP-3000), detector de arranjo de diodos (DAD 3000), coluna de fase reversa ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5  $\mu$ m) e coluna guarda de mesma fase. As condições cromatográficas seguiram a metodologia adaptada de Gabardo *et al.* (2021) e podem ser graficamente visualizadas na Figura 3.

Dessa forma, a vazão da condição ficou estabelecida em 0,40 mL/min, a temperatura da coluna configurada a 25 °C e o volume de injeção ajustado para 20  $\mu$ L. Na sequência, para fase móvel, utilizou-se acetonitrila e água, em proporção de 20% até 90% de acetonitrila nos primeiros 15 minutos, quando permaneceu contínua por 10 minutos. Após o período, a condição cromatográfica retornou a 20% de acetonitrila em 5 minutos, e permaneceu dessa forma por 2 minutos até iniciar uma nova corrida. Em decorrência do processo, cada corrida cromatográfica possuiu duração de 32 minutos, cujos cromatogramas obtiveram-se através do software Cromelion VR 7.2.



**Figura 3.** Gradiente da fase móvel durante a corrida cromatográfica. Eluição por gradiente ACN:Água, vazão 0,4 mL/min, volume de injeção 20  $\mu$ L (Fonte: Autoria própria).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 VALIDAÇÃO METODOLÓGICA

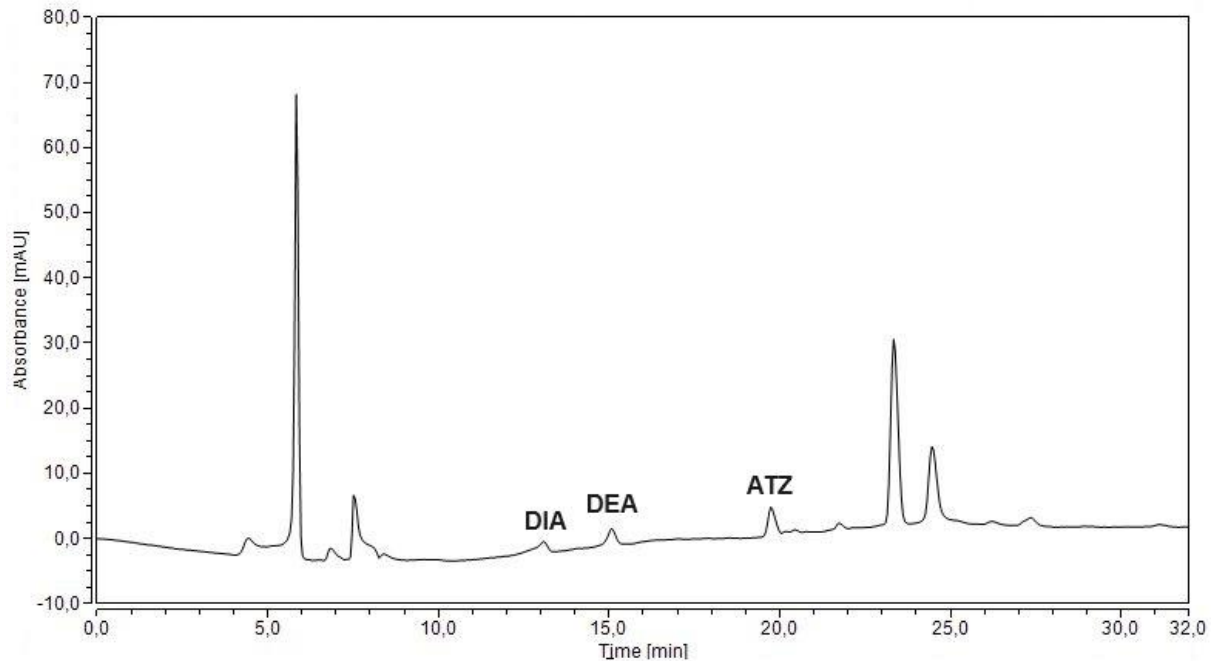
A atrazina gera uma grande quantidade de metabólitos (Burken & Schonoor, 1997), porém as primeiras vias de degradação bióticas são responsáveis pelos primeiros e principais metabólitos, DIA e DEA (Meyer & Elsner, 2013), o que indica metabolização da atrazina por parte do indivíduo. Sendo assim, para a determinação da ATZ e dos seus metabólitos primários, DIA e DEA, utilizou-se como fonte primária de informações os trabalhos anteriores do laboratório abrangendo os mesmos compostos (Gabardo *et al.*, 2021).

Dessa forma, o comportamento das moléculas foram visualizados no comprimento de onda ( $\lambda$ ) equivalente a 221 nm. Os tempos de retenção podem ser observados a partir da Tabela 2 e os cromatogramas da Figura 4. A visualização próxima dessa faixa de comprimento de onda já havia sido observada em outros trabalhos, garantindo a confiança de que os picos gerados eram equivalentes aos referidos compostos (Steinheimer, 1993; Arnold *et al.*, 1995; Prukjareonchook *et al.*, 2022).

**Tabela 2** - Tempos de retenção da ATZ, DIA e DEA.

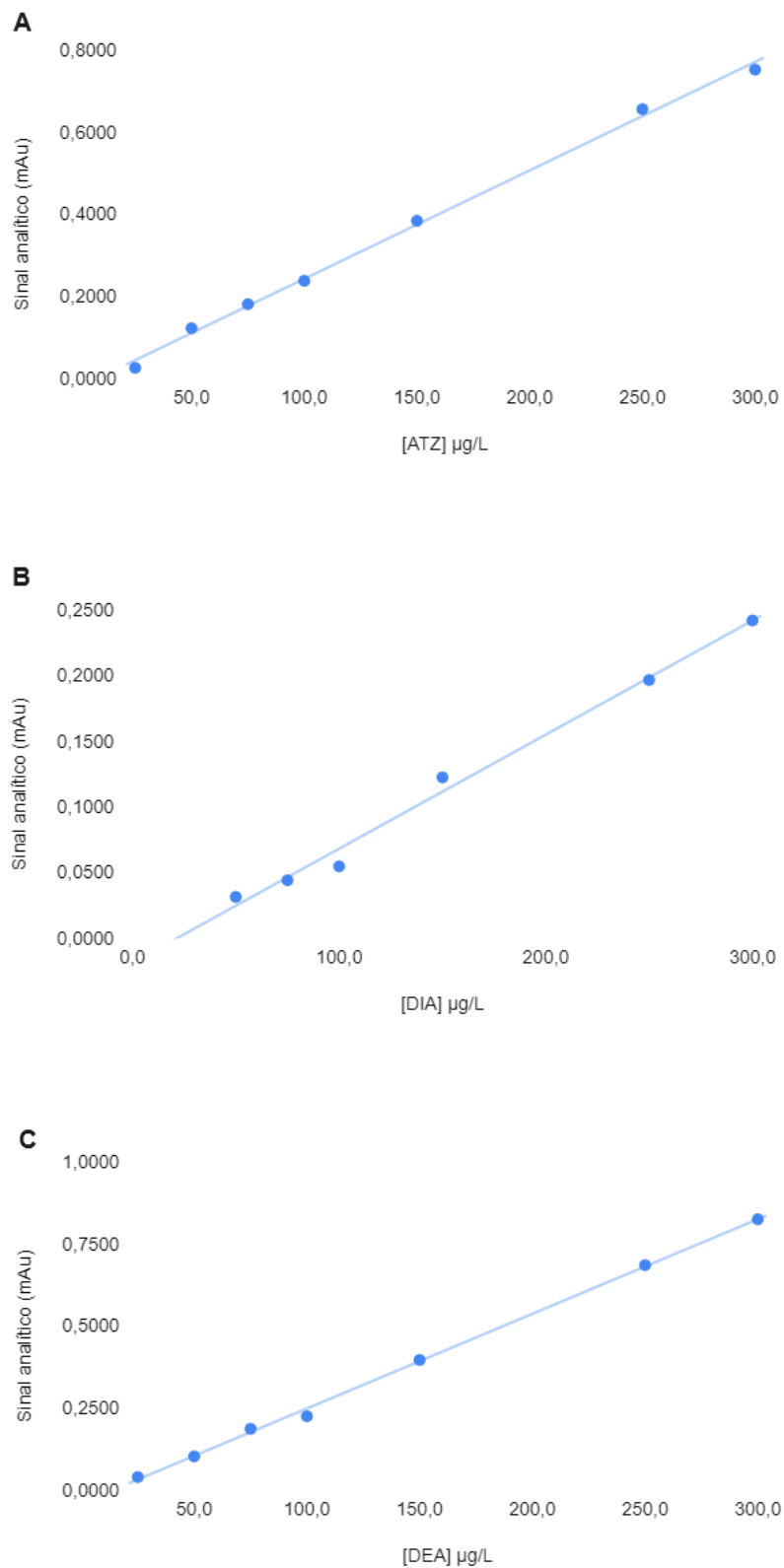
<b>Composto</b>	<b>ATZ</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>
<b>Tempo de retenção (min)</b>	19,73	13,09	15,08

Fonte: Autoria própria.



**Figura 4.** Cromatograma do comportamento da ATZ, DIA e DEA em solução de 300 µg/L, após o método QuEChERS. Eluição por gradiente ACN:Água, vazão 0,4 mL/min, volume de injeção 20 µL ( $\lambda=221$  nm) (Fonte: Autoria própria).

As curvas analíticas para a ATZ, DIA e DEA podem ser observadas na Figura 5, com faixas de concentrações para a construção das curvas que variaram entre 25 e 300 µg/L. Os coeficientes de correlação obtidos foram acima de 0,99 como é indicado pela ANVISA (Brasil, 2017) e apresentou linearidade a 95% (Tabela 3). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é uma medida utilizada para indicar que duas variáveis são diretamente proporcionais, ou seja, enquanto uma medida aumenta a outra também aumenta. Isso significa que quando o  $R^2$  é próximo a 1, a equação da reta gerada pelo coeficiente de regressão fornece um valor proporcional à concentração real do analito contido dentro da amostra.



**Figura 5.** Curva analítica da ATZ (A), DIA (B) E DEA (C) em água ultrapura. Os pontos de concentração das curvas são 25, 50, 75, 100, 150, 250 e 300 µg/L (Fonte: Autoria própria).

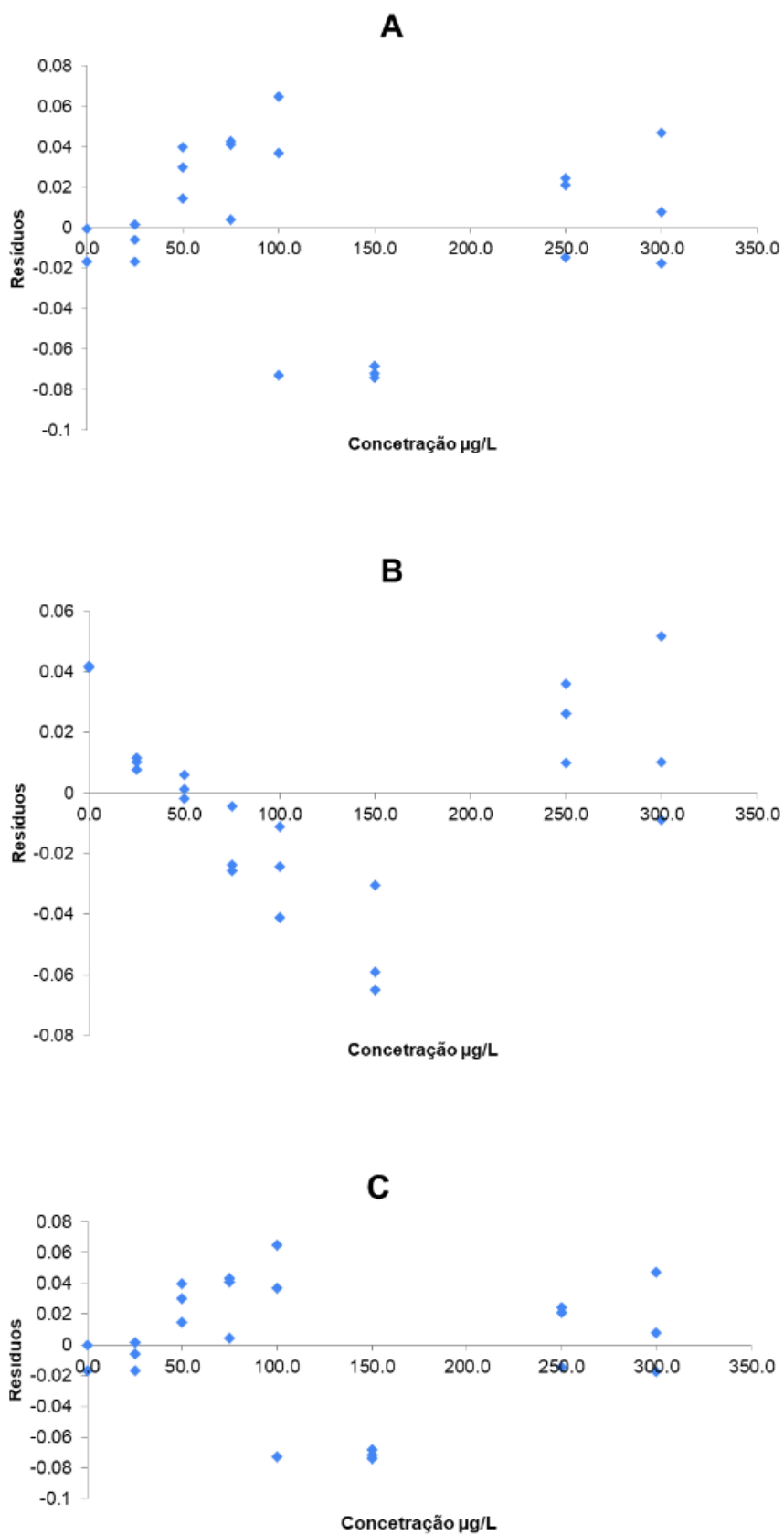
**Tabela 3** - Parâmetros de validação analítica do método de análise de ATZ, DIA e DEA utilizando Quechers e HPLC-DAD (n=3).

Parâmetros	ATZ	DIA	DEA
Comprimento de onda ( $\lambda$ ) (nm)	221	221	221
Equação da reta	$y=0,00312x+0,107$	$y=0,00087x-0,0183$	$y=0,00289x-0,0382$
Coefficiente de determinação ( $R^2$ )	0,997	0,991	0,999
LD ( $\mu\text{g/L}$ )	5,60	11,75	7,42
LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	16,98	35,63	22,49

Fonte: Autoria própria.

Apesar da escassez de trabalhos na literatura envolvendo a metodologia HPLC-DAD em embriões de galinha, Souza *et al.* (2013) obtiveram LD de 0,015  $\mu\text{g/g}$  e LQ 0,050  $\mu\text{g/g}$ , considerando equivalência a  $\mu\text{g/mL}$ , na análise de ATZ através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) em ovos de galinha liofilizados. Outro trabalho envolvendo o HPLC-DAD acoplado a matriz de dispersão em fase sólida (MSPD) indicou LD de 0,7  $\text{ng/g}$  e LQ de 2  $\text{ng/g}$  na determinação de atrazina em matriz vegetal. Frente a esses dados, os valores encontrados neste trabalho são considerados elevados, principalmente porque a legislação brasileira não permite valores maiores que 2  $\mu\text{g/L}$ , indicando necessidade de aprimoramento de sensibilidade do método.

Na Figura 6 é possível observar gráficos de dispersão dos resíduos, que também têm caráter de homocedasticidade. Para realizar um modelo de regressão eficaz, os resíduos devem exibir uma variância constante à medida que os valores preditos aumentam. Dessa forma, a dispersão dos resíduos ao longo do eixo y desses gráficos não demonstra mudanças significativas conforme os valores. Sendo assim, indica que o modelo está capturando de maneira consistente a variabilidade dos dados em diferentes níveis da variável independente, fortalecendo as inferências e previsões do modelo.



**Figura 6.** Gráficos de dispersão de resíduos de ATZ (A), DIA (B) e DEA (C) (Fonte: Autoria própria).



Os valores de repetibilidade e precisão intermediária podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Repetibilidade e precisão intermediária para os analitos ATZ, DIA e DEA através de HPLC-DAD (n=3).

<b>Analitos</b>	<b>Concentração de Referência</b>	<b>Repetibilidade de (DPR %)*</b>	<b>Precisão intermediária de (DPR%)</b>
<b>ATZ</b>	Mínima (25 µg/L)	6,15	6,15
	Média (100 µg/L)	3,74	3,74
	Alta (300 µg/L)	1,55	1,55
<b>DIA</b>	Mínima (50 µg/L)	13,17	13,17
	Média (150 µg/L)	10,73	10,73
	Alta (300 µg/L)	6,17	6,17
<b>DEA</b>	Mínima (25 µg/L)	18,43	18,43
	Média (100 µg/L)	11,02	11,02
	Alta (300 µg/L)	2,56	2,56

Fonte: Autoria própria. \*DPR = desvio padrão relativo.

Considerando os critérios de aceitação para repetibilidade da AOAC para fins comparativos (AOAC, 2023), os resultados envolvendo concentrações da faixa 25 ou 50 ppb (µg/kg) não devem ultrapassar valor de 21% de DPR, enquanto as faixas de 100, 150 e 300 ppb (µg/kg) não ultrapassaram 30%, garantindo veracidade da repetibilidade do método baseado em uma fonte oficial de legislação internacional.

## 6.2 ANÁLISE DOS EMBRIÕES

Alimentos orgânicos são alternativas mais saudáveis para consumidores que buscam diminuir a absorção de agrotóxicos em sua alimentação, sendo o ovo um dos produtos visados neste contexto (Anderson, 2009; Guney & Giraldo, 2019). Dessa forma, os ovos orgânicos tornam-se cada vez mais populares devido à

característica como produção local, alta qualidade, melhor sabor e mais saudáveis, visto a ausência de contaminantes nas regiões onde são produzidos (Anderson, 2009; Mesas *et al.*, 2022). Sendo assim, a utilização de ovos orgânicos neste estudo é justificada pela facilidade de obtenção, pelo baixo custo, e também pela perspectiva de que não apresentam contaminação ambiental de nenhum tipo de agrotóxico, como a atrazina.

Durante toda a amostragem, apenas um ovo estava rachado e foi descartado antes da injeção, portanto, realizaram-se um total de 143 (n=143) injeções nos ovos de galinha em três grupos distintos: controle, tratados com ATZ 500 µg/L (tratamento 1) e tratados com ATZ 1000 µg/L (tratamento 2). Os tipos e quantidades de injeções podem ser visualizadas de acordo com a Tabela 5.

**Tabela 5** - Tipos de injeção e total de amostras resultantes do dia 0 de incubação.

<b>Tipo de Injeção</b>	<b>Número de amostras</b>
Água destilada	72 ovos
Atrazina 500 µg/L	48 ovos
Atrazina 1000 µg/L	23 ovos*
<b>Total = 143 ovos</b>	

Fonte: Autoria própria. \*Um ovo desse grupo estava rachado, portanto foi descartado.

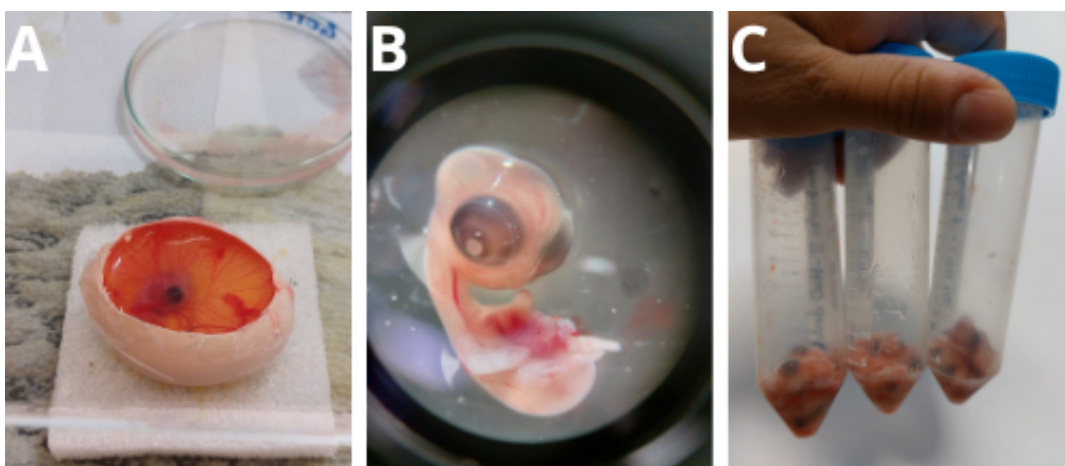
O primeiro grupo do experimento foi intitulado como modelo piloto, em que injetou-se água destilada em uma dúzia (n=12) de ovos de galinha. Neste grupo, apenas a metade (n=6) dos embriões estavam vivos, pois 4 estavam inférteis e 2 estavam mortos, sendo que um apresentava hemorragia e múltiplas malformações (membros e caudal).

Esse primeiro modelo foi obtido no mês de julho de 2023, onde as temperaturas mínimas da cidade de Foz do Iguaçu chegaram a 4°C. Essa informação é relevante pois a temperatura do ambiente possui relação direta com o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus* (Shim & Pesti, 2011; Noiva *et al.*, 2014). Primeiramente, mudanças significativas na temperatura perturbam a homeostase das galinhas, que buscam regular o metabolismo para balancear a

perda energética gasta em manter a homeostase (Melo *et al.*, 2016). Segundo a literatura, temperaturas abaixo de 6°C afetam diretamente a produção de ovos de galinhas poedeiras, sendo este fato relacionado com a diminuição em níveis de diversos minerais e hormônios, além da diminuição da taxa de conversão alimentar (Kucuk *et al.*, 2003). Diante desses fatos, é possível afirmar que a temperatura é uma variável ambiental que afeta a mortalidade dos embriões durante o desenvolvimento embrionário (Noiva *et al.*, 2014). Para além disso, é possível levantar a hipótese de que a taxa de infertilidade também seja relacionada ao frio, uma vez que, em baixas temperaturas, diversos pontos cruciais na deposição de ovos pelas galinha são afetados.

Com estes ensaios realizado com o grupo piloto foi possível aprender as noções iniciais sobre a fisiologia dos embriões, como detecção de mortalidade, reconhecimento de malformações e verificação do tempo de estagiamento; e para familiaridade com os métodos em si, tanto na manipulação do embrião *in ovo* (Figura 7), quanto em testes das condições modificadas do método QuEChERS.

É importante ressaltar que o modelo piloto foi de suma importância para a continuação de toda a metodologia, uma vez que apesar do método QuEChERS já ter sido realizada em ovos de galinha (Yingjie *et al.*, 2014; Corrias *et al.*, 2021), a metodologia ainda não havia sido testada diretamente em embriões segundo a literatura consultada. Isso implicou, por exemplo, na não adição de água durante a fase inicial de homogeneização da amostra, visto que a matriz já é extremamente aquosa, portanto a adição de água se tornou dispensável. Essa é uma característica desejável no preparo de amostra através do QuEChERS, uma vez que a água nesse processo é necessária para a partição das moléculas de pesticidas para a fase orgânica durante o processo de *salt out* (Perestrelo *et al.*, 2019). Em contrapartida, a água afeta a eficácia do processo ao solubilizar os agrotóxicos que possuem propriedades de alta solubilidade em água, como é o caso da ATZ, interferindo na recuperação do analito.



**Figura 7.** Manipulação dos embriões *in ovo* até o momento da coleta. Os embriões que estão nos suportes vitais (A) são removidos, limpos e visualizados em lupa (B) para, enfim, serem coletados em tubos falcon, num total de 8 a 12 embriões (C) (Fonte: Autoria própria).

No tratamento 1 ocorreram os testes iniciais de quantificação de ATZ, DIA e DEA. Neste grupo, as injeções somaram 4 dúzias (n=48) contendo água destilada e 4 dúzias (n=48) contendo ATZ 500 µg/L, todos na frequência de uma dúzia controle para uma dúzia tratamento. Essa concentração foi escolhida a partir de trabalhos anteriores no laboratório, em que utilizaram como concentração máxima 500 µg/L de glifosato (GLY) e 2 µg/L de ATZ (Fischer *et al.*, 2021) para análise de efeitos em embriões.

Os dados de mortalidade estão sintetizados na Tabela 6. É importante ressaltar que os testes cromatográficos foram realizados com uma quantidade menor de embriões em relação à amostragem inicial da incubação no dia 0. Isso se deve ao simples fato de que alguns ovos não continham embriões presentes, seja por morte precoce do embrião (Figura 8A), seja por indicativo de infertilidade (Figura 8B). Sendo assim, os testes cromatográficos ocorreram nas amostras onde se tinham embriões vivos ou mortos, porém presentes, no momento da coleta.

Com isso, a mortalidade difere em apenas 2 ovos no grupo controle e tratamento 1, mostrando que essa concentração não foi capaz de alterar significativamente a sobrevivência dos embriões. Porém, destaca-se o fato de que o grupo submetido ao tratamento 1 teve uma leve taxa de infertilidade maior do que o grupo controle. Novamente, houve uma queda de temperatura no mês de agosto em Foz do Iguaçu (mínimas de 7°C), que durou cerca de 10 dias, e isso pode ter relação direta com o aumento das infertilidades.

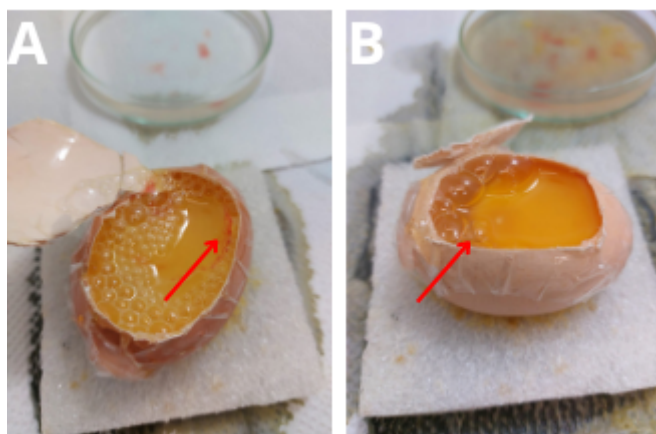
Sob outro viés, os dados de anomalias no grupo controle revelam: 12 casos de hemorragia, presente em todos os embriões mortos e 5 em vivos; um caso de malformação de membros em um dos embriões mortos; e um caso de malformação múltipla de olho e encéfalo em um único embrião, também morto. Por outro lado, o grupo sob o tratamento 1 demonstrou: 10 casos de hemorragias, 3 seguidos de malformações cefálicas; uma malformação nos membros e uma malformação no tronco, sendo que o único embrião morto estava com malformação nos membros e hemorragia no momento da coleta.

Apesar do relato de maiores malformações no grupo ATZ em comparação ao grupo controle, ainda não é possível afirmar que esse composto foi a causa do aumento de malformações, devido a causas variáveis e não completamente compreendidas. Além disso, a alta taxa de hemorragia nos dois grupos pode estar mais relacionada com a manipulação dos embriões *in ovo* do que com defeitos durante o desenvolvimento embrionário, pois os embriões são extremamente delicados e molengas, necessitando de cuidado especial na coleta que nem sempre evitava alguma danificação do organismo. De toda forma, os dados obtidos foram bastantes similares com os resultados de Fischer *et al.* (2021), pois nesta concentração o GLY concentrado em sinergia com a ATZ em baixa concentração não demonstraram relevância estatística suficiente para associar os efeitos nos embriões com os agrotóxicos.

**Tabela 6** - Dados de coleta dos embriões no dia 7 de incubação para o tratamento 1 utilizando testes para 500 µg/L de atrazina.

<b>Tipo de injeção</b>	<b>Embrião no momento da coleta</b>	<b>Tipos de malformações observadas</b>	<b>Número de amostras</b>
	Vivo	Olhos, Cefálica e Hemorragia	26 ovos
	Morto com embrião	Membros e Hemorragia	7 ovos
Água Destilada	Fecundado porém não desenvolvido	Sem malformações	5 ovos
	Ovo infértil	Sem malformações	10 ovos
			<b>Total = 48 ovos</b>
	Vivo	Membros, Tronco, Cefálica e Hemorragia	28 ovos
	Morto com embrião	Membros e Hemorragia	1 ovo
Atrazina 500 µg/L	Fecundado porém não desenvolvido	Sem malformações	5 ovos
	Ovo infértil	Sem malformações	14 ovos
			<b>Total = 48 ovos</b>

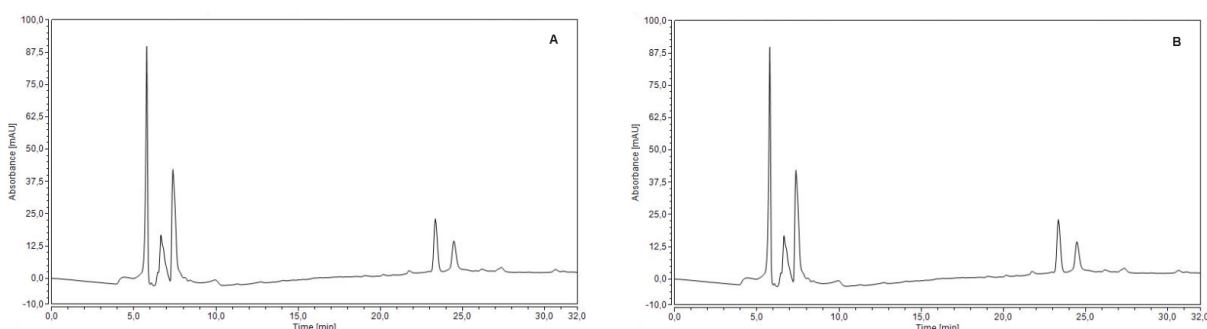
Fonte: Autoria própria.



**Figura 8.** Ovo com faixa de sangue, cujo embrião está morto sem causa definida (A). Ovo com sinal de infertilidade (B) (Fonte: Autoria própria).

A Figura 9 apresenta os resultados das corridas cromatográficas dos grupos controle (Figura 9A) e provenientes do tratamento 1 (Figura 9B). Segundo a análise do cromatograma dos grupos tratados, não foi possível observar a presença de nenhum pico definido nos tempos de retenção estabelecidos para nenhum dos metabólitos, como observado anteriormente na Figura 4. Além disso, a comparação dos cromatogramas do grupo tratado com o grupo controle também não revelou diferenças significativas entre os ruídos observados em nenhum dos compostos.

A hipótese principal foi de que os embriões não seriam capazes de absorver a atrazina na referida concentração, portanto uma dosagem mais concentrada se tornou a alternativa principal para o prosseguimento de novos testes.



**Figura 9.** Cromatograma do grupo controle (A) x grupo submetido ao tratamento 1 com ATZ a 500  $\mu\text{g/L}$  (B) (Fonte: Autoria própria).

O tratamento 2 marca os testes finais de quantificação da ATZ, e seus metabólitos, na concentração de ATZ 1000  $\mu\text{g/L}$ . Na amostragem deste grupo,

somaram-se injeções de 1 dúzia (n=12) com água destilada e 2 dúzias (n=23) com ATZ 1000 µg/L. Dito isso, como a frequência de amostras foi diferente no controle e no tratamento 2, optou-se utilizar as porcentagens das mortalidades em relação ao total de cada grupo como via de comparação.

Os dados da mortalidade dos embriões e das taxas de malformações, referentes ao tratamento 2, estão resumidos na Tabela 7. É interessante notar que no grupo controle não houve nenhuma malformações, enquanto no grupo tratado apenas um embrião continha malformação, a cefálica. Inclusive, o único embrião presente, porém morto, do grupo submetido ao tratamento 2, não apresentava sinais de hemorragia nem malformação. Assim, ainda no grupo tratado, houveram 3 casos de hemorragia em embriões vivos, o que está intimamente relacionado com o aprimoramento da manipulação dos embriões *in ovo*, corroborando com a hipótese apresentada para o grande número de hemorragias mencionado anteriormente. Portanto, a conclusão é de que uma única malformação não pode estar diretamente relacionada com os efeitos tóxicos da atrazina sobre o desenvolvimento embrionário. A mortalidade também não pode ser atribuída à atrazina, uma vez que a porcentagem de óbitos no grupo controle foi maior que no grupo submetido ao tratamento 2, equivalente a 33% e 27%, respectivamente.

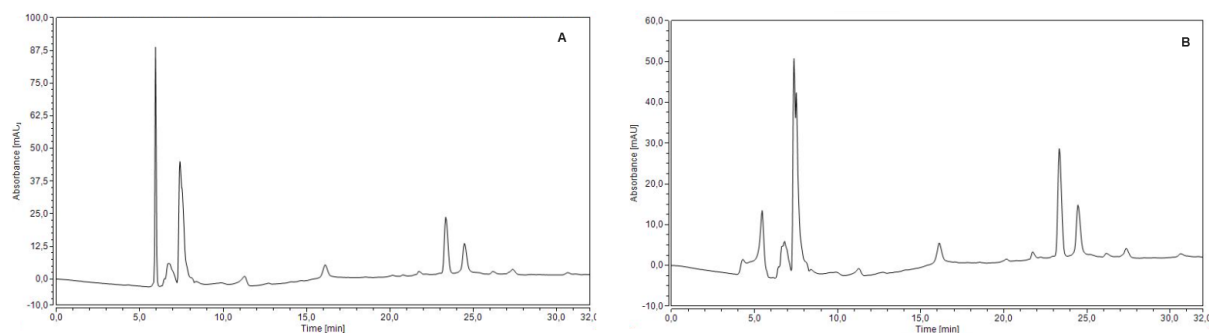


**Tabela 7** - Dados de coleta dos embriões no dia 7 de incubação para o tratamento 2 utilizando testes de 1000 µg/L de atrazina.

<b>Tipo de injeção</b>	<b>Embrião no momento da coleta</b>	<b>Tipos de malformações observadas</b>	<b>Número de amostras</b>
	Vivo	Sem malformações	8 ovos
	Morto com embrião	Sem malformações	0 ovos
Água Destilada	Fecundado porém não desenvolvido	Sem malformações	1 ovo
	Ovo infértil	Sem malformações	3 ovos
			<b>Total = 12 ovos</b>
	Vivo	Cefálica e Hemorragia	18 ovos
	Morto com embrião	Sem malformação	1 ovo
Atrazina 1000 µg/L	Fecundado porém não desenvolvido	Sem malformações	1 ovo
	Ovo infértil	Sem malformações	3 ovos
			<b>Total = 23 ovos</b>

Fonte: Autoria própria.

A Figura 10 apresenta os resultados das corridas cromatográficas dos grupos controle (Figura 10A) e provenientes do tratamento 2 (Figura 10B). Como é possível observar, novamente picos não foram formados no tempo de retenção estabelecido e também não houve diferença significativa na comparação entre os modelos de embriões tratados com o grupo controle, indicando a ausência da ATZ e de seus metabólitos nas amostras.



**Figura 10.** Cromatogramas dos grupos controle (A) x grupos sob o tratamento 2 com ATZ a 1000 µg/L (B) (Fonte: Autoria própria).

Em síntese, não foi possível afirmar que os embriões absorveram ATZ em seus tecidos, e nem que houve uma via de metabolização primária para gerar os resíduos DIA e DEA. Em decorrência, também não foi possível estabelecer uma relação de bioacumulação nos embriões. As explicações para tal não puderam ser estabelecidas, entretanto a utilização de duas concentrações diferentes, além da validação analítica, aumentam a confiabilidade das análises estabelecidas através deste protocolo desenvolvido.

Existem diversos motivos pelos quais os organismos não indicaram absorção de ATZ. A injeção na câmara de ar para atingir o embrião tem como objetivo simular o funcionamento de uma placenta, de forma que uma barreira física impeça a passagem de elementos tóxicos para o embrião, e esse fato pode ter contribuído para uma absorção limitada da ATZ. O mecanismo de metabolização e excreção do embrião também pode ser suficiente para absorver e logo eliminar a concentração do químico. A ATZ também pode se ligar a alvos específicos dentro do organismo, como proteínas ou outras moléculas orgânicas, dificultando a extração dos analitos durante o preparo de amostras ou interferindo a análise durante a corrida cromatográfica, visto que os gráficos das amostras contém picos que podem significar tanto os solventes da corrida quanto algum interferente do processo. O tempo de exposição durante a incubação pode não ter sido suficiente para que o embrião comece a absorver o composto. A concentração administrada pode ainda não ser suficiente para bioacumulação, sendo possível realizar testes ainda mais extrapolados para encontrar algum resquício de bioacumulação da ATZ pelo embrião. Por fim, o limite de detecção pode estar acima do valor de concentração que está contido dentro do embrião, portanto aparelhos mais sensíveis podem ser

utilizados como novos testes de verificação de bioacumulação da ATZ, como por exemplo a cromatografia gasosa para tentar verificar a concentração do agrotóxico, visto que o mesmo apresenta um comportamento volátil.

Para encerrar, é importante ressaltar que esse é um resultado positivo do ponto de vista ambiental, uma vez que o estudo comprova que, mesmo em uma concentração 500x maior do que a concentração permitida em legislação para águas potáveis, a ATZ não foi capaz de se bioacumular nos tecidos dos embriões. Portanto, mesmo que seja um contaminante presente em diversos relatos ecossistêmicos, um maior esclarecimento sobre a sua atuação e perigos reais pode ser propagada, focando atenção dos pesquisadores em outros possíveis efeitos da ATZ para a saúde, e também em outras classes de agrotóxicos que ainda possuem informações muito limitadas, e que continuam sendo utilizados em massa no Brasil.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto trabalho, não foi possível detectar os analitos atrazina, DIA e DEA em nenhum dos grupos tratados, e em nenhuma das concentrações administradas. Isso se deve a uma grande gama de possibilidades, desde a concentração ainda ser baixa para o efeito de bioacumulação, até simplesmente a possibilidade dos embriões de galinha não bioacumularem a atrazina. Dessa forma, esse estudo conseguiu fornecer evidências de que a concentração regida por legislação não apresenta riscos para bioacumulação em aves.

Com a validação metodológica consolidada, trabalhos futuros podem abordar diferentes técnicas e testes para verificar a presença de atrazina em embriões de *Gallus gallus*. O primeiro teste sugerido é verificar se não houve retenção da atrazina no ovo, e, caso se assim determinado, quais os mecanismos de proteção que atuam na capacidade de impedir uma intoxicação embrionária por parte dos constituintes do ovo. Outro possível teste seria a verificação das amostras por cromatografia GC, uma vez que a volatilidade dos analitos pode ser detectada com maior sensibilidade no aparelho.

Por fim, este trabalho corrobora trabalhos anteriores para verificação de agrotóxicos em embriões de aves. As informações sobre intoxicações animais na fase de desenvolvimento embrionário são escassas, sendo necessários cada vez mais trabalhos que garantam a segurança dos químicos presentes na natureza e que apontem quais possíveis riscos esses animais estão expostos.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, H. H. *et al.* Chromatographic Methods for Analysis of Triazine Herbicides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 226–240, 2014.

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025/2017**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

AHMAD, R.; RAHMAN, A. Sorption Characteristics of Atrazine and Imazethapyr in Soils of New Zealand: Importance of Independently Determined Sorption Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10866–10875, 2009.

AKASHE, M. M. *et al.* Classification of Pesticides: a Review. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v. 9, n. 4, p. 144–150, 2018.

ÁLVARO-ALONSO, E. A. *et al.* Development and validation of a HPLC-UV method for methadone hydrochloride quantification in a new oral solution with preservatives to be implemented in physicochemical stability studies. **BMC Chemistry**, v. 16, n. 1, 2022.

ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. **Journal of environmental quality (USA)**, v. 24, n. 6, p. 1156-1162, 1995.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDERSON, J. L.; ARMSTRONG, D. W. High-Stability Ionic Liquids. A New Class of Stationary Phases for Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4851–4858, 2003.

ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, p. 772–789, 2004.

AOAC. Official methods of analysis, 22nd ed. **Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg, 2023.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009.

ARCAIN, B. M. S. *et al.* Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 84, n. 15, p. 632–648, 2021.

BARBOSA, R. S. *et al.* The possible consequences of exposure to pesticides: a systematic review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.

BARDULLAS, U. *et al.* Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 2, p. 263–272, 2011.

BARR, D. B. *et al.* Assessing Exposure to Atrazine and Its Metabolites Using Biomonitoring. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 10, p. 1474–1478, 2007.

BARRIUSO, E.; HOUOT, S. Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 10-11, p. 1341–1348, 1996.

BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9-10, p. 547–557, 2002.

BAUR, F. J.; ENSMINGER, L. G. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 4, p. 171–172, 1977.

BEACON, T. H.; DAVIE, J. R. The chicken model organism for epigenomic research. **Genome**, v. 64, n. 4, p. 476–489, 2021.

BESSE-HOGGAN, P. *et al.* Atrazine biodegradation modulated by clays and clay/humic acid complexes. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 10, p. 2837–2844, 2009.

BLAHOVA, J. *et al.* Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 103370, 2020.

BOJARSKI, B. *et al.* Effects of embryonic cadmium exposure on erythrocyte indices and morphology in newly hatched Gallus gallus domesticus chicks. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101862, 2022.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)>. Acesso em: 13 de maio de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 141, de 25 de julho de 2017**, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2017.

BRYŁA, M. *et al.* Toxicopathological effects of ochratoxin A and its diastereoisomer under in ovo conditions and in vitro evaluation of the toxicity of these toxins against the embryo Gallus gallus fibroblast cell line. **Poultry Science**, v. 102, n. 2, p. 102413, 2023.

BURKEN, J. G.; SCHNOOR, J. L. Uptake and Metabolism of Atrazine by Poplar Trees. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 5, p. 1399–1406, 1997.

BURROWS, H. D. *et al.* Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, n. 2, p. 71–108, 2002.

CALDAS, E. D. *et al.* Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 28, n. 1, p. 71–79, 2011.

CAMPOS-PEREIRA, F. D. *et al.* Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 170–177, 2012.

CARLOS, R. M. DE *et al.* Evaluation of different QuEChERS procedures for the recovery of selected drugs and herbicides from soil using LC coupled with UV and pulsed amperometry for their detection. v. 407, n. 4, p. 1217–1229, 2015.

CARMO, D. A. DO. *et al.* Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 133–143, 2013.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu (RJ). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 2, p. 473–482, 2005.

CHAN, T.; BURGGREN, W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 145, n. 2-3, p. 251–263, 2005.

CHIARELLO, M. *et al.* Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e a ocupação do solo. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 158-165, 2016.

CHOWDHURY, I. F. *et al.* Persistence of atrazine and trifluralin in a clay loam soil undergoing different temperature and moisture conditions. **Environmental Pollution**, v. 276, p. 116687, 2021.

COOPER, R. L. Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary-Ovarian Function. **Toxicological Sciences**, v. 53, n. 2, p. 297–307, 2000.

COOPER, R. L. *et al.* Effect of atrazine on ovarian function in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 257–264, 1996.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

CUATRECASAS, P. *et al.* Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, n. 2, p. 636–643, 1968.

ARAÚJO, D. F. DE S. *et al.* The concentration of minerals and physicochemical contaminants in conventional and organic vegetables. **Food Control**, v. 44, p. 242–248, 2014.

DELLA-FLORA, A. *et al.* Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**, v. 10, n. 45, p. 5447–5452, 2018.

DONNA, A. *et al.* Carcinogenicity testing of atrazine: preliminary report on a 13-month study on male Swiss albino mice treated by intraperitoneal administration. **Giornale Italiano Di Medicina Del Lavoro**, v. 8, n. 3-4, p. 119–121, 1986.

EPSHTEIN, N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. **Drug development & registration**, v. 8, n. 2, p. 122–130, 2019.

ERICKSON, L. E. *et al.* Degradation of atrazine and related s-triazines. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 1989.

ERIKSEN, M. S. *et al.* Prenatal exposure to corticosterone impairs embryonic development and increases fluctuating asymmetry in chickens (*Gallus gallus domesticus*). **British Poultry Science**, v. 44, n. 5, p. 690–697, 2003.

FALKOWSKA, L.; REINDL, A. R. Dietary exposure to, and internal organ transfer of, selected halogenated organic compounds in birds eating fish from the Southern Baltic. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 10, 2015.

FANG, H. *et al.* Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 457–465, 2015.

FISCHER, A. *et al.* Efeitos sinérgicos da atrazina e glifosato no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, 2021.

FREITAS, A. D. DE; REGINO, J. E. B. A legislação para a quantidade permitida de agrotóxicos na água: os casos do Brasil e da União Europeia. **INFORME ECONÔMICO (UFPI)**, v. 41, n. 2, 2020.

FRY, D. M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 7, p. 165–171, 1995.



GABARDO, R. P. *et al.* Determination of atrazine and main metabolites in natural waters based on a simple method of QuEChERS and liquid chromatography coupled to a diode-array detector. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106392–106392, 2021.

GAMA, A. F. *et al.* Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 462–467, 2013.

GAMMON, D. W. *et al.* A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. **Pest Management Science**, v. 61, n. 4, p. 331–355, 2005.

GARCÍA, A. M. Pesticide exposure and women's health. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 44, n. 6, p. 584–594, 2003.

GHOSH, K. P.; PHILIP, L. Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its removal by biological processes: an overview. **Global NEST Journal**, v. 8, n. 2, p. 159–178, 2006.

GONÇALVES, G. M. DA S. *et al.* Uso de agrotóxicos e a relação com a saúde na etnia Xukuru do Ororubá, Pernambuco, Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 21, n. 4, p. 1001–1012, 2012.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. *et al.* Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015.

GUNKEL, G. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis* müll.) and a fish (*Coregonus fera* jurine). **Water Research**, v. 14, n. 11, p. 1573–1584, 1980.

HAGE, D. S. Chromatography. **Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry**, p. 1–32, 2018.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental Dynamics**, v. 195, n. 4, p. 231–272, dez. 1992.

HAMILTON, D. *et al.* Pesticide residues in food-acute dietary exposure. **Pest Management Science**, v. 60, n. 4, p. 311–339, 2004

HAMMOND, C. L. *et al.* In ovo temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 15, p. 2667–2675, 2007.

HANSEN, A. M., *et al.* Atrazina: Un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 29, p. 65–84, 2013.

HAYES, T. B. *et al.* Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 64–73, 2011.

HOLLAWAY *et al.* Comparison of sulfonylurea herbicide residue detection in soil by bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay and hplc. **Weed Research**, v. 39, n. 5, p. 383–397, 1999.

HONG, J. *et al.* Degradation of Residual Herbicide Atrazine in Agri-Food and Washing Water. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2416, 2022.

HOUOT, S. *et al.* Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 615–625, 2000.

HUSSAIN, R. *et al.* Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2010.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre a Validade Técnica dos Resultados de Ensaio. Rio de Janeiro, 2020

INOUE-CHOI, M. *et al.* Atrazine in public water supplies and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in the Iowa Women's Health Study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 73, n. 9, p. 582–587, 2016.

JABLONOWSKI, N. D. *et al.* Metabolism and Persistence of Atrazine in Several Field Soils with Different Atrazine Application Histories. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12869–12877, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. *et al.* Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, p. 996–1012, 2009.

JIANG, W. *et al.* Coexisting antibiotic changes the persistence and metabolic profile of atrazine in the environment. **Chemosphere**, v. 269, p. 129333–129333, 2021.

JIAO, Y. *et al.* Okadaic Acid Exposure Induced Neural Tube Defects in Chicken (*Gallus gallus*) Embryos. **Marine Drugs**, v. 19, n. 6, p. 322, 2021.

KAH, M. *et al.* Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4487–4492, 2007.

KEHRIG, H. A. *et al.* Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 377–384, 2011.

KNIEWALD, J. *et al.* Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 20, n. 1, p. 61–68, 2000.

KORNILOVSKAYA, I. N. *et al.* Histological studies of atrazine toxicity on the thyroid gland in rats. **Biomedical and environmental sciences**, v. 9, n. 1, p. 60–66, 1996.

KRUGER, E. L. *et al.* Persistence and degradation of [<sup>14</sup>C]atrazine and [<sup>14</sup>C]deisopropylatrazine as affected by soil depth and moisture conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 1959–1967, 1993.

KUCKA, M. *et al.* Atrazine Acts as an Endocrine Disrupter by Inhibiting cAMP-specific Phosphodiesterase-4. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 19–26, 2012.

KUMAR, A.; SINGH, N. Atrazine and its metabolites degradation in mineral salts medium and soil using an enrichment culture. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 3, 2016.

KUMAR, V. *et al.* Thin-Layer Chromatography: Comparative Estimation of Soil's Atrazine. **Current World Environment Journal**, v. 8, n. 3, p. 469–472, 2013.

KURTH, D. *et al.* Measuring the internal concentration of volatile organic compounds in small organisms using micro-QuEChERS coupled to LVI–GC–MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 25, p. 6041–6052, 2017.

LI, J. *et al.* The MEK/ERK/CREB signaling pathway is involved in atrazine induced hippocampal neurotoxicity in Sprague Dawley rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 673–681, 2019.

LIAN, Y. *et al.* Determination of 11 hormones residues in chicken using QuEChERS sample preparation method with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Food Safety and Quality**, v.5, n. 2, p.384-392, 2014.

LIMA, C. *et al.* Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, n. 2, p. 234–254, 2018.

LIMA, F. A. N. DE S. E *et al.* Territórios indígenas e determinação socioambiental da saúde: discutindo exposições por agrotóxicos. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 28–44, 2022.

LIMA, G. P. P. *et al.* Organic and conventional fertilization procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 5, n. 3, p. 188–193, 2012.

LIN, T. *et al.* Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. **Chemosphere**, v. 72, n. 1, p. 122–128, 2008.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MA, K. *et al.* Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 11, p. 2915–2924, 2015.

MACFARLANE, E. *et al.* Dermal Exposure Associated with Occupational End Use of Pesticides and the Role of Protective Measures. **Safety and Health at Work**, v. 4, n. 3, p. 136–141, 2013.

- MALLMANN, A. O. *et al.* Influência da qualidade micotoxicológica e nutricional de híbridos de milho no custo da ração de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 1659–1668, 28 out. 2019.
- MATSUSHITA, S. *et al.* Effects of In Ovo Exposure to Imazalil and Atrazine on Sexual Differentiation in Chick Gonads. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1641–1647, 2006.
- MCWILLIAM, I. G. The comparison of detectors for gas chromatography. **Journal of Applied Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 379–388, 1959.
- MEGIATO, E. I. *et al.* Impacts of integration of Brazil with the European Union through a general equilibrium model. **EconomiA**, v. 17, n. 1, p. 126–140, 2016.
- MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766, 2015.
- NASSERI, S. *et al.* Fate of atrazine in the agricultural soil of corn fields in fars province of Iran. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 6, n. 4, p. 223–232, 2009.
- NIELL, S. *et al.* Comparison of extraction solvents and conditions for herbicide residues in milled rice with liquid chromatography-diode array detection analysis (LC-DAD). **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 2, p. 206–211, 2010.
- NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8–35, 2009.
- OERKE, E.-C. .; DEHNE, H.-W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, v. 23, n. 4, p. 275–285, 2004.
- OLEJNIK, A. M. *et al.* In Vitro Studies on Atrazine Effects on Human Intestinal Cells. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1-4, p. 401–411, 2010.
- PALMA, P. *et al.* Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 74, n. 5, p. 676–681, 2009.
- PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Atrazine and Human Health. **International Journal of Ecosystem**, v. 1, n. 1, p. 14–23, 2012.
- PÉREZ, D. J. *et al.* Atrazine uptake, translocation, bioaccumulation and biodegradation in cattail (*Typha latifolia*) as a function of exposure time. **Chemosphere**, v. 287, p. 132104, 2022.
- PERIS-VICENTE, J. *et al.* Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples. **Microchemical Journal**, v. 177, p. 107309.

PERSSON, B; VESSMAN, J. The use of selectivity in analytical chemistry – some considerations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 526–532, 2001.

POIGER, T. *et al.* Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1588–1596, 2016.

POPP, J. *et al.* Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 1, p. 243–255, 2012.

PREEZ, H. H. D.; VUREN, J. H. J. V. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 651–655, 1992.

RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2020.

REINDL, A. R. *et al.* Chlorinated herbicides in fish, birds and mammals in the Baltic Sea. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 8, 2015l.

RESENDE, N. C. *et al.* Impacts of regional climate change on the runoff and root water uptake in corn crops in Parana, Brazil. **Agricultural Water Management**, v. 221, p. 556–565, 2019.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. DE L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROHR, J. R.; MCCOY, K. A. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 1, p. 20–32, 2010.

ROSTAMI, S. *et al.* Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102019, 2021.

ROUSSEAU, S. *et al.* Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, n. 2-3, p. 211–222, 2001.

SAFARI, M. *et al.* Magnetic nanoparticle assisted supramolecular solvent extraction of triazine herbicides prior to their determination by HPLC with UV detection. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 1, p. 203–210, 1 set. 2015.

SANDERSON, J. T. *et al.* Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 1, p. 44–54, 2002.

SANTACRUZ-MÁRQUEZ, R. *et al.* The effects of inhaled pollutants on reproduction in marginalized communities: a contemporary review. **Inhalation Toxicology**, p. 1–18, 2023.

SARAJI, M.; TANSAZAN, N. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phenylurea herbicides in water samples by HPLC-diode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23-24, p. 4186–4192, 2009.

SASS, J. B.; COLANGELO, A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. **International journal of occupational and environmental health**, v. 12, n. 3, p. 260–7, 2006.

SAWASDEE, B.; KÖHLER, HEINZ-R. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1539–1547, 2009.

SCALISI, E. M. *et al.* Toxicity assessment of two-dimensional nanomaterials molybdenum disulfide in *Gallus gallus domesticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110772, 2020.

SENE, L. *et al.* New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487–496, 2010.

SHANKAR MURTHY, K. *et al.* A review on toxicity of pesticides in Fish. **International Journal of Open Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 15–36, 2013.

SHIMABUKURO, R. H.; SWANSON, H. R. Atrazine metabolism, selectivity, and mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 199–205, 1969.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. HPLC: Isocratic or Gradient Elution and Assessment of Linearity In Analytical Methods. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 02, p. 12–20, 2022.

SINCLAIR, C. J.; BOXALL, A. B. A. Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 20, p. 4617–4625, 2003.

SINGH, S. *et al.* Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 211–237, 2017.

SMITH, P. N. *et al.* Assessment of risks to listed species from the use of atrazine in the USA: a perspective. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 24, n. 6, p. 223–306, 2021.

SOLOMON, K. R. *et al.* Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 31–76, 1996.

SOLOMON, K. R. *et al.* Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 721–772, 2008.

STREIT, B. Bioaccumulation processes in ecosystems. **Experientia**, v. 48, n. 10, p. 955–970, 1992.

TARIQ, M. I. *et al.* Pesticides exposure in Pakistan: A review. **Environment International**, v. 33, n. 8, p. 1107–1122, 2007.

THOUEILLE, P. *et al.* Development and validation of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the monitoring of temsavir plasma concentrations in people living with HIV. **Journal of Chromatography B**, v. 1214, p. 123575–123575, 2023.

THURMAN, E. M. *et al.* Formation and Transport of Deethylatrazine and Deisopropylatrazine in Surface Water. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 13, p. 2267–2277, 1994.

TYOHEMBA, R. L. *et al.* Bioaccumulation of current-use herbicides in fish from a global biodiversity hotspot: Lake St Lucia, South Africa. **Chemosphere**, v. 284, p. 131407, 2021.

VALENTINI S. R. *et al.* Validação de Métodos Analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2022.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

VERBIC, T. *et al.* Selectivity in analytical chemistry. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 58, p. 569-575, 2013.

VICTOR-COSTA, A. B. *et al.* Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 323–331, 2010.

VILCHES-MOURE, J. G. Embryonic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a Model of Cardiac Biology and Development. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 3, p. 184–203, 2019.

VILLANUEVA, C. M. *et al.* Atrazine in municipal drinking water and risk of low birth weight, preterm delivery, and small-for-gestational-age status. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 62, n. 6, p. 400–405, 2005.

VONBERG, D. *et al.* Atrazine Soil Core Residue Analysis from an Agricultural Field 21 Years after Its Ban. **Journal of Environmental Quality**, v. 43, n. 4, p. 1450–1459, 2014.

WANG, P.; KELLER, A. A. Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions. **Water Research**, v. 43, n. 5, p. 1448–1456, 2009.

WIEGAND, C. *et al.* Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 199–205, 2001.

WILHELMS, K. W. *et al.* Atrazine and the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis in Sexually Maturing Precocial Birds: Studies in Male Japanese Quail. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 152–160, 2005.

WILHELMS, K. W. *et al.* *In Ovo* Exposure to a Triazine Herbicide: Effects of Atrazine on Circulating Reproductive Hormones and Gonadal Histology in Young Japanese Quail. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 117–122, 2006.

WILLIAMS, M. M. *et al.* Performance consistency of reduced atrazine use in sweet corn. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 96–104, 2011.

WIRBISKY, S.; FREEMAN, J. Atrazine Exposure and Reproductive Dysfunction through the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis. **Toxics**, v. 3, n. 4, p. 414–450, 2015.

XU, J. *et al.* A multiresidue analytical method for the detection of seven triazolopyrimidine sulfonamide herbicides in cereals, soybean and soil using the modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 7, n. 23, p. 9791–9799, 2015.

YADAV, I.; DEVI, N. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. **Environmental Science and Engineering**, v. 6, p. 140-158, 2017.

YANG, L. *et al.* Quantification of caffeoylquinic acids and triterpenes as targeted bioactive compounds of *Centella Asiatica* in extracts and formulations by liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography Open**, v. 4, p. 100091–100091, 2023.

YUAN, B. *et al.* Toxic effects of atrazine on porcine oocytes and possible mechanisms of action. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179861, 2017.

ZABLOTOWICZ, R. M. *et al.* Glufosinate and ammonium sulfate inhibit atrazine degradation in adapted soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 1, p. 19–26, 2008.

ZHANG, C. *et al.* Atrazine triggers hepatic oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix C. coturnix*) via blocking Nrf2-mediated defense response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, p. 49–56, 1 mar. 2017.



ZHONG, Q. *et al.* In-situ ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of triazine herbicides. **Microchimica Acta**, v. 178, n. 3-4, p. 341–347, 14 jun. 2012.