

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE ATRAZINA E METABÓLITOS EM EMBRIÕES DE AVE

DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR THE ANALYSIS OF
ATRAZINE AND METABOLITES IN BIRD EMBRYOS

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE
ATRAZINA Y METABOLITOS EN EMBRIONES DE AVE

Gustavo de França Silva¹
Luana Estefani Knaul²
Angie Rocio Barrera Contreras³
Beatriz Mitidiero Stachissini Arcain⁴
Carla Vermeulen Carvalho Grade⁵
Marcela Boroski⁶

RESUMO

A atrazina (ATZ) é um desregulador endócrino associado a efeitos tóxicos durante o desenvolvimento embrionário. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para avaliar a bioacumulação de atrazina em embriões de galinha (*Gallus gallus*). 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 1.000 µg/L. A coleta dos embriões ocorreu após 5 ou 7 dias de incubação. Os embriões foram preparados para análise utilizando a metodologia QuE-ChERS (sigla para Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, and Safe), seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). A validação analítica interna da metodologia foi realizada. Os limites de detecção (LD) para ATZ, desisopropilatrazina (DIA) e desetilatrazina (DEA) foram de 5 µg/L, 11 µg/L e 7 µg/L, e os limites de quantificação (LQ) foram de 16 µg/L, 25 µg/L e 22 µg/L, respectivamente. A metodologia proposta apresentou resultados satisfatórios, com boa repetibilidade (DPR < 18%). Em relação aos resultados obtidos, a atrazina e seus metabólitos, DIA e DEA, não foram detectados nos embriões em nenhuma das concentrações administradas. As taxas de mortalidade e de malformações também foram avaliadas, mas não foram observadas discrepâncias significativas que permitissem associar os efeitos da atrazina a desvios no padrão de desenvolvimento embrionário. Estudos futuros devem ser conduzidos para confirmar se embriões de aves são incapazes de bioacumular atrazina e para assegurar que o uso desse pesticida não afete a saúde animal ao nível de desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE

Contaminação de alimentos, toxicidade, validação analítica, agrotóxicos.

ABSTRACT

Atrazine (ATZ) is an endocrine disruptor associated with toxic effects during embryonic development. Thus, this study aimed to develop a protocol to evaluate atrazine bioaccumulation in chicken embryos (*Gallus gallus*). 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 1.000 µg/L. Embryo collection occurred 5 or 7 days after incubation. Embryos were prepared for analysis using the QuEChERS methodology (an acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, and Safe), followed by analysis through high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). In-house analytical validation of the methodology was performed. The limits of detection (LD) for ATZ, desisopropylatrazine (DIA) and desethylatrazine (DEA) were 5 µg/L, 11 µg/L and 7 µg/L, and limits of quantification (LQ) were 16 µg/L, 35 µg/L and 22 µg/L respectively. The proposed methodology presented satisfactory results with good repeatability (RSD < 18%). Regarding the results obtained, atrazine and its metabolites, DIA and DEA, 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 if 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

Food contamination, toxicity, analytical validation, pesticides.

RESUMEN

La atrazina (ATZ) es un disruptor endocrino asociado a efectos tóxicos durante el desarrollo embrionario. Así, este estudio tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para evaluar la bioacumulación de atrazina en embriones de gallina (*Gallus gallus*). La metodología utilizada se basó en el tratamiento *in ovo* de tres grupos de embriones: un grupo 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 1.000 µg/L. La recolección de los embriones se realizó 5 o 7 días después de la incubación. Los embriones fueron preparados para el análisis mediante la metodología QuEChERS (acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*), seguida del análisis por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se realizó la validación analítica **interna** de la metodología. Los límites de detección (LD) para ATZ, desisopropilatrastina (DIA) y desetilatrastina (DEA) fueron de 5 µg/L, 11 µg/L y 7 µg/L, respectivamente, y los límites de cuantificación (LQ) fueron de 16 µg/L, 35 µg/L y 22 µg/L, respectivamente. La metodología propuesta presentó resultados satisfactorios, con buena repetibilidad (RSD < 18%). En cuanto a los resultados obtenidos, la atrazina y sus metabolitos, DIA y DEA, no fueron detectados en los embriones en ninguna de las concentraciones administradas. También se evaluaron las tasas de mortalidad y malformación, pero no se observaron discrepancias significativas que permitieran asociar los efectos de la atrazina con desviaciones del patrón normal de desarrollo embrionario. Estudios futuros deben llevarse a cabo para confirmar si los embriones de aves son incapaces de bioacumular atrazina y para asegurar que el uso de este pesticida no afecta la salud de los animales a nivel del desarrollo.

PALABRAS CLAVE

Contaminación alimentaria, toxicidad, validación analítica, pesticidas.

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem contribuído para o aumento da produtividade agrícola, entretanto, sua aplicação excessiva ou inadequada pode resultar na contaminação do meio ambiente (JARDIM *et al.*, 2009). No Brasil, um dos maiores produtores mundiais de milho (RESENDE *et al.*, 2019), essa preocupação torna-se especialmente relevante, uma vez que a cultura do milho está fortemente associada ao uso do herbicida atrazina (ATZ). Além disso, a União Europeia constitui um dos principais mercados de exportação brasileiros (MEGIATO *et al.*, 2016), o que reforça a necessidade de controle rigoroso de resíduos de agrotóxicos. Considerando que o milho é amplamente utilizado como matéria-prima na produção de ração animal (MALLMANN *et al.*, 2019), os resíduos de atrazina e de seus produtos de degradação podem alcançar a cadeia alimentar, sendo detectados em produtos de origem animal, como carnes, leite, derivados e ovos (HONG *et al.*, 2022).

A ATZ (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 decomposição da ATZ gera diversos metabólitos, e as rotas mais relatadas envolvem a hidrólise, desalquilação, descloração e desaminação da ATZ (BURKEN; SCHNOOR, 1997; GHOSH; PHILIP, 2006; BARR *et al.*, 2007; ROSTAMI *et al.*, 2021). A N-desalquilação da ATZ forma seus dois principais metabólitos, a deetilatrastina (DEA) e a deisopropilatrastina (DIA).

Diversos estudos de toxicidade têm avaliado os efeitos da ATZ em mamíferos e aves adultas (DONNA *et al.*, 1986; KORNILOVSKAYA *et al.*, 1996; WILHELMS *et al.*, 2005; HUSSAIN *et al.*, 2010), cuja exposição ocorre principalmente por meio da ingestão de água e alimentos contaminados (SMITH *et al.*, 2021). Entretanto, ainda são escassas as informações sobre os efeitos da ATZ durante o desenvolvimento embrionário, especialmente no que se refere à sua bioacumulação e aos possíveis impactos sobre os padrões normais de desenvolvimento.

Os embriões de galinha-doméstica (*Gallus gallus*) são amplamente reconhecidos como um modelo biológico consolidado na pesquisa básica, em razão de suas características bem estabelecidas e da disponibilidade de metodologias específicas para estudos em embriologia (VILCHES-MOURE, 2019). Nesse contexto, ovos de galinha têm sido empregados como modelo experimental em bioensaios de toxicidade envolvendo diferentes classes de contaminantes, incluindo metais pesados (BOJARSKI *et al.*, 2022), nanomateriais (SCALISI *et al.*, 2020), toxinas de origem animal (JIAO *et al.*, 2021), toxinas microbianas (BRYŁA *et al.*, 2023) e agrotóxicos (FRY *et al.*, 1995; ARCAIN *et al.*, 2021).

Embora alguns estudos tenham demonstrado efeitos adversos da ATZ sobre o desenvolvimento embrionário da galinha-doméstica (MATSUSHITA *et al.*, 2006), ainda são limitadas as informações sobre sua bioacumulação nesse estágio de desenvolvimento. A bioacumulação consiste na absorção gradual de uma substância pelo organismo, resultando no aumento de sua concentração ao longo do tempo (STREIT, 1992). Nesse sentido, a ATZ apresenta potencial de bioacumulação em diferentes compartimentos biológicos, como peixes (PREEZ; VUREN, 1992), plantas (PÉREZ *et al.*, 2022) e tecidos de aves predatórias, incluindo músculos e fígado, por meio da ingestão de presas contaminadas (REINDL *et al.*, 2015). Entretanto, a escassez de estudos voltados à avaliação da bioacumulação de ATZ em embriões limita a compreensão de seus potenciais efeitos durante o desenvolvimento inicial, reforçando a relevância do uso de *Gallus gallus* como modelo biológico para essa investigação.

O método QuEChERS ('Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe') destaca-se pela sua eficiência no preparo de amostras biológicas destinadas à análise de pesticidas e contaminantes emergentes em matrizes complexas (FILIGENZI *et al.*, 2019; SLÁMOVÁ *et al.*, 2020; NOGUEIRA *et al.*, 2024). Embora existam estudos que aplicaram o método QuEChERS em ovos de galinha para a determinação de resíduos de pesticidas (OZGUR *et al.*, 2021), bem como em modelos embrionários aquáticos, como embriões de peixe-zebra (KURTH *et al.*, 2017), a aplicação desse método em embriões de *Gallus gallus* submetidos a tratamento *in ovo*, associada à avaliação da bioacumulação de atrazina e seus metabólitos, ainda não foi adequadamente explorada.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um protocolo analítico para a determinação da bioacumulação de ATZ e de seus metabólitos DIA e DEA em embriões de galinha (*Gallus gallus*), utilizando a metodologia QuEChERS para extração e preparo das amostras, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES, INSUMOS CROMATOGRÁFICOS E DESENHO EXPERIMENTAL

Os padrões analíticos ATZ (99,1%), DIA (97,5%) e DEA (99,5%), acetonitrila (HPLC grade $\geq 99,0\%$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) anidro, C18 e PSA foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A água ultra-pura foi obtida por meio do sistema de purificação de água Elga (Purelab Option - Q), com resistividade de 18,2 M Ω cm. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (PA). Preparou-se uma solução de ATZ a 1000 mg/L em acetonitrila, e por diluição em água ultrapura, prepararam-se as soluções a 500 e 1000 $\mu g/L$, empregadas no tratamento dos embriões.

Os ovos foram obtidos por um comerciante orgânico local de Foz do Iguaçu, Paraná, entre os meses de julho e setembro de 2023 ($n = 131$). Os tratamentos foram realizados em experimentos independentes, sendo em quadruplicata para o tratamento 1 e duplicata para o tratamento 2, havendo controles individuais para cada repetição, para tornar a amostra o mais homogênea possível. O controle foi realizado utilizando água destilada autoclavada ($n = 60$) e para os tratamentos, utilizou-se solução de ATZ a 500 $\mu g/L$ (tratamento 1) ($n = 48$) e a 1.000 $\mu g/L$ (tratamento 2) ($n = 23$). Essas concentrações foram escolhidas com base em experimentos anteriores (FISCHER *et al.*, 2021; UTZIG *et al.*, 2021).

2.2 TRATAMENTO, COLETA E ANÁLISE DOS EMBRIÕES

O presente trabalho está conforme os padrões éticos estabelecidos pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), e foi aprovado pela Comissão de Ética Animal da UNILA (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - UNILA) (processo número 23422.013434/2023-17).

No dia zero, os ovos fertilizados ($n = 131$) foram limpos, pesados em balança analítica e verificados para rachaduras na casca, sendo realizado o descarte de ovos danificados. Em seguida, os ovos intacos foram contaminados de forma aguda, por meio de uma única injeção na câmara de ar (ARCAIN *et al.*, 2021; FISCHER *et al.*, 2021; UTZIG *et al.*, 2021), em capela exaustora de gases. Por meio de uma abertura de aproximadamente 1 mm (feita com a ponta de uma tesoura esterilizada) foi injetado 1 μL da concentração específica do agrotóxico diluído em água ou apenas água (controle) para cada grama de ovo (conforme ARCAIN *et al.*, 2021). Considerando a massa dos ovos (41,37 - 65,52 g), esta proporção variou de 41,37 a 65,52 $\mu L/g$. Após a inoculação, a abertura foi fechada com cola quente. Os ovos foram mantidos em incubadora a $37,5 \pm 0,3^\circ C$, com umidade constante e virador automático por um período de 5 ou 7 dias, mantidos em posição vertical com a câmara de ovos voltada para cima durante as primeiras 2 horas e, a partir de então, horizontalmente.

No dia 5 (tratamento 2, controles $n = 12$ e tratados = 23) ou 7 (tratamento 1, controles $n = 48$ e tratados $n = 48$) de incubação foi realizada a coleta dos embriões, por meio da abertura de janela (conforme ARCAIN *et al.*, 2021). Foi então verificada a mortalidade dos embriões, sendo os embriões classificados em vivos, mortos ou ausência de embrião (Figura 1). Os ovos não fertilizados foram des-

considerados das análises. Em seguida o embrião foi retirado do ovo, limpo das membranas extraembrionárias em PBS, e analisado para malformações em lupa. Foi realizado o estadiamento do embrião segundo Hamburger e Hamilton (1992) e a pesagem em balança analítica. Por fim, os embriões foram armazenados em tubos falcon e levados ao freezer a 20°C. Os testes cromatográficos foram realizados com os embriões vivos ou mortos, porém detectáveis no momento da coleta.

Para avaliar as diferenças estatísticas de mortalidade, taxa de malformações, peso e estadiamento dos embriões, foram considerados apenas os embriões do tratamento 1 (ATZ a 500 µg/L) e respectivo controle (n = 71). Na análise de mortalidade foram considerados mortos embriões detectáveis (n = 17), sendo avaliada a presença de batimento cardíaco no momento da abertura do ovo, descartando das análises ovos inférteis ou embriões não desenvolvidos (n = 25). Quanto à análise de malformação, peso e estadiamento, foram considerados apenas os embriões vivos (n = 54). As variáveis de mortalidade e presença de malformações foram transformadas em porcentagem. As variáveis de peso (em grama) e estadiamento (em HH) foram transformadas em média, levando em conta apenas os dados dos embriões vivos.

2.3 PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO QUECHERS

O preparo das amostras de embriões seguiu a metodologia QuEChERS adaptada de Anastasiades *et al.* (2003), Slámová *et al.* (2020) e Gabardo *et al.* (2021). Os tubos falcon contendo os embriões foram retirados do freezer até atingirem a temperatura ambiente (25°C). As amostras foram preparadas a partir de pools de embriões (KURTH *et al.*, 2017), sendo reunidos de 8 a 12 embriões por tubo, de acordo com a disponibilidade de material biológico obtido a partir de 12 ovos incubados, resultando em aproximadamente 5 mL de volume de amostra por tubo. Posteriormente, os embriões foram homogeneizados em 10 mL de acetonitrila (1:2, v/v) e triturados em ultra-turrax (IKA, T18 ULTRA TURRAX®) por 1 minuto.

Na etapa subsequente, adicionaram-se 4.000 mg de MgSO anidro e 1.000 mg de NaCl. O tubo foi imediatamente levado ao vórtex (Phoenix Lufenco) por 1 minuto e, em seguida, à centrífuga (Hettich Zentrifugen) por 15 minutos a 4.000 rpm. Na etapa de limpeza, 2 mL da fase orgânica obtida após a precipitação foram transferidos para um novo tubo Falcon de 15 mL contendo 300 mg de MgSO anidro, 100 mg de C18 e 50 mg de PSA. O tubo foi novamente submetido ao vórtex e centrifugado nas mesmas condições previamente descritas. Na etapa final, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um vial de 2 mL, após filtragem em PTFE hidrofílico de membrana de 0,22 µm. Os vials contendo as amostras foram armazenados em um freezer (-20°C) até o momento da análise cromatográfica.

Preparou-se a solução dos padrões analíticos, ATZ, DIA e DEA, individualmente, a 1000 mg/L em acetonitrila. Para a curva analítica foi preparado um mix dos padrões a 500 mg/L, e por diluição em água ultrapura, prepararam-se as concentrações individuais de 25 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L, 100 µg/L, 150 µg/L, 250 µg/L, e 300 µg/L. O método QuEChERS foi implementado na construção da curva analítica em água ultrapura. A metodologia se conduziu da mesma forma, porém no lugar dos embriões, foram adicionadas 5 mL das concentrações individuais, seguido da adição de acetonitrila.

Para a validação analítica da metodologia, as curvas analíticas foram preparadas em triplicata. O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido a partir das regressões lineares construídas no Microsoft

Excel®, enquanto os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente, conforme as diretrizes do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020).

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

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

Onde:

S = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação da curva analítica.

A precisão foi avaliada com base na repetibilidade e na precisão intermediária, conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2008).

2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As amostras foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Dionex UltiMate 3000 series, Thermo Fisher Scientific), equipado com detector de fluorescência (FLD), com bomba quaternária (LGP-3400 SD), injetor (WSP-3000). Para a separação dos compostos foi implementada a coluna de fase reversa ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5 µm). As condições cromatográficas seguiram a metodologia adaptada de Gabardo *et al.* (2021), onde foi implementada uma vazão de 0,4 mL/min, a temperatura da coluna configurada a 25 °C e o volume de injeção ajustado para 20 µL.

A fase móvel consistiu em (A) água ultrapura e (B) de acetonitrila. A eluição por gradiente iniciou com 20% B, subiu gradualmente a 90% B por 15 min, se manteve constante durante 10 min, voltou finalmente a 20% B por 5 min e manteve se assim durante 2 min até o início de uma nova corrida; totalizando 32 min. Foram monitorados os comprimentos de onda (λ) de 221 nm foi utilizado para ATZ e 213 nm para DIA e DEA, sendo os compostos identificados comparando-se o tempo de retenção e os espectros UV dos analitos com padrões conhecidos.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

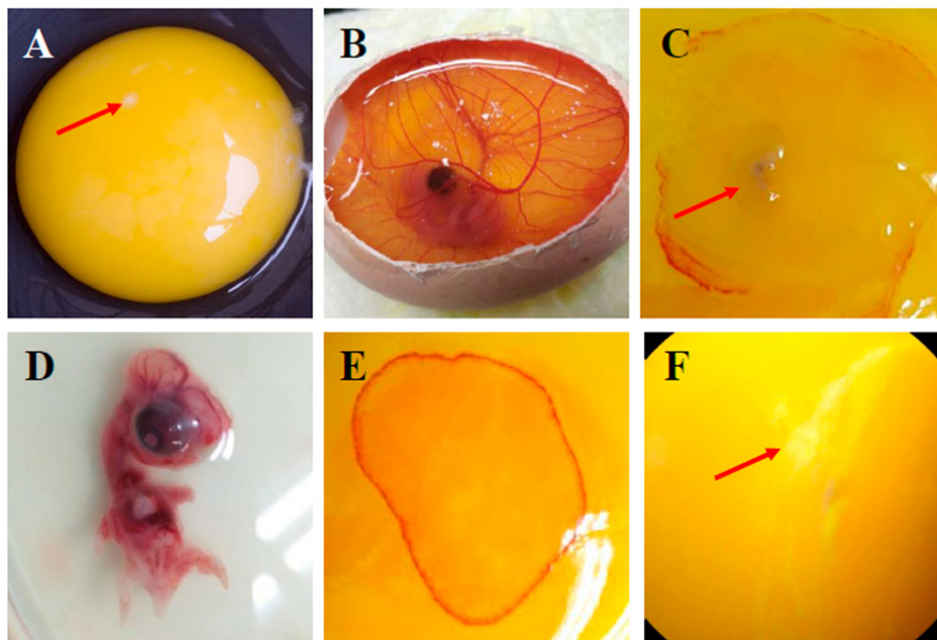
Para avaliar as diferenças estatísticas entre os embriões do tratamento 1 e seus respectivos controles, utilizando como variáveis a porcentagem de mortalidade e malformações, assim como as médias dos pesos e dos estadiamentos dos embriões vivos, a normalidade dos dados foi primeiramente avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Com base nos resultados de normalidade, o teste t de Student foi aplicado para dados com distribuição normal, ou o teste de Mann-Whitney para dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DOS EMBRIÕES

Os embriões submetidos ao tratamento 1 (ATZ a 500 µg/L) e respectivo controle foram examinados quanto à mortalidade no momento da coleta, conforme indica a Figura 1.

Figura 1 Análise de mortalidade dos embriões do tratamento 1 (ATZ a 500 µg/L). A: ovo infértil (ausência de embrião). A seta vermelha indica o blastodisco infértil; B: embrião vivo no estágio de desenvolvimento esperado (aproximadamente HH33); C: embrião morto em estágio precoce, a seta vermelha indica o embrião; D: embrião morto coletado; E: presença somente de sangue, indicando embrião ausente; F: indefinido com membrana esbranquiçada, considerado infértil (embrião ausente).

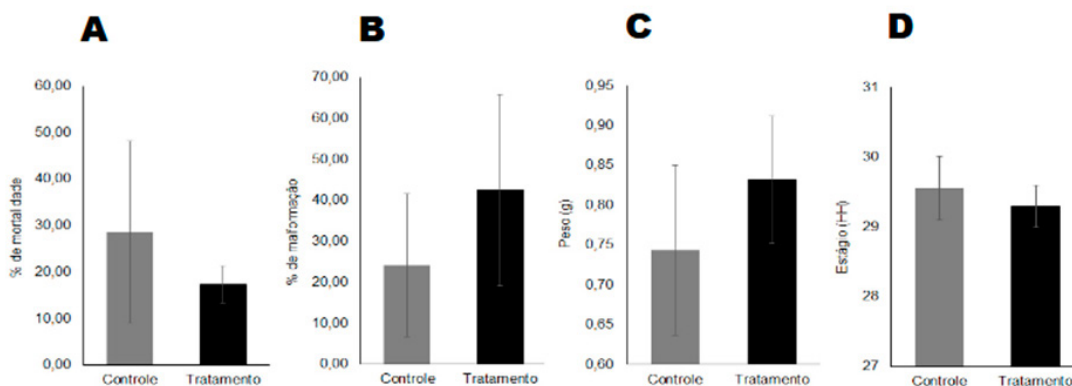


Fonte: Dados da Pesquisa

As análises demonstraram que não houve diferença entre o grupo controle e o tratamento 1 em relação à mortalidade ($p = 0,30787$) (Figura 2A; material suplementar 1 e 5), mostrando que a concentração de ATZ a 500 µg/L não foi capaz de alterar significativamente a sobrevivência dos embriões, em relação aos embriões controle. De forma semelhante, as análises demonstraram que, apesar de o grupo tratado ter apresentado um maior número de malformações em relação ao controle (material

suplementar 2 e 5), não houve diferença significativa ($p = 0,25596$) (Figura 2B). Não houve também diferença significativa quanto ao peso ($p = 0,24135$) (Figura 2C; material suplementar 3 e 5) ou estadiamento dos embriões ($p = 0,37854$) (Figura 2D; material suplementar 4 e 5). Resultados prévios do nosso grupo indicaram padrão semelhante para o tratamento de embriões com ATZ diluída a 2, 20 e 200 $\mu\text{g/L}$ (UTZIG *et al.*, 2021). No Brasil, o limite máximo permitido de resíduos deste herbicida foi estabelecido em 2 $\mu\text{g/L}$ (Portaria nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde). Entretanto, deve-se ressaltar que os tratamentos realizados no presente estudo foram de injeção única (teste agudo), e podem ocultar os efeitos do consumo crônico desse composto (RATNAIKE, 2003; BRINGOLF *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2022) diluído em água potável.

Figura 2 Análise de mortalidade (A), porcentagem de malformação (B), peso em gramas (C) e estágios de Hamburger–Hamilton (HH) (D) dos embriões do tratamento 1 e respectivo controle. Barras indicam médias \pm desvio padrão dos experimentos independentes. Não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$).

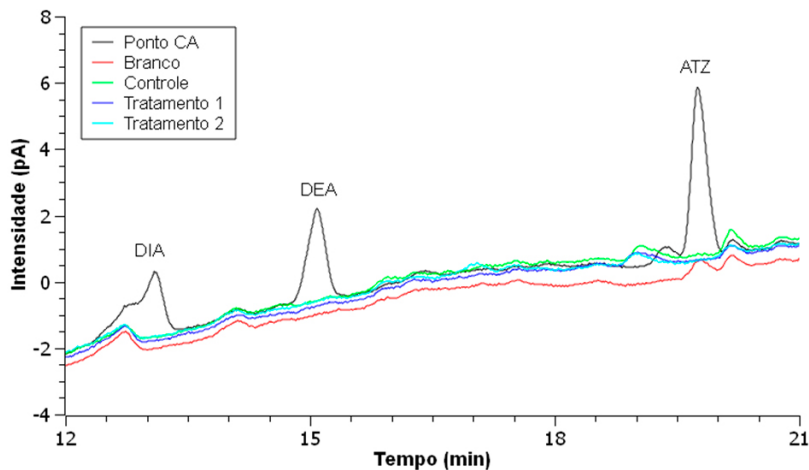


Fonte: Dados da Pesquisa

3.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A ATZ gera uma grande quantidade de metabólitos (BURKEN; SCHNOOR, 1997), porém as primeiras vias de degradação bióticas são responsáveis pela formação dos dois principais metabólitos, o DIA e DEA (CABRAL; DI BERNARDO, 2017). A Figura 3 apresenta os cromatogramas obtidos a partir das soluções padrão dos analitos, bem como das amostras de embriões dos tratamentos 1 e 2. Os padrões analíticos de ATZ, DIA e DEA apresentaram picos bem definidos, com adequada simetria e separação cromatográfica, sem sobreposição com sinais da matriz, evidenciando a seletividade do método. Além disso, os tempos de retenção distintos permitiram a identificação inequívoca de cada composto e a quantificação individual dos analitos.

Figura 3 Cromatograma representando o comportamento da ATZ em embriões. A linha preta indica o ponto mais alto da curva analítica (CA 300 µg/L). As linhas vermelha e verde correspondem, respectivamente, ao branco e ao controle do ensaio. A linha azul-escuro representa o grupo exposto ao tratamento com ATZ na concentração de 500 µg/L e a linha azul-claro ao tratamento com ATZ na concentração de 1.000 µg/L.



Fonte: Dados da Pesquisa

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de validação analítica. Os coeficientes de correlação obtidos foram acima de 0,99 e apresentaram linearidade a 95%. Os gráficos dos resíduos para todos os analitos em ambas as curvas mostraram que os erros estavam uniformemente distribuídos e sem valores discrepantes – o que indica claramente homoscedasticidade.

Diversos estudos já avaliaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos de pesticidas principalmente inseticidas em embriões de *Gallus gallus*, identificando malformações congênitas, estresse oxidativo, inflamação do miocárdio, entre outros danos (ABBAS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2023; MANDAL *et al.*, 2023; ALY *et al.*, 2025). No entanto, não foram encontrados estudos que utilizem a metodologia QuEChERS associada à HPLC-DAD para avaliar especificamente a embriotoxicidade causada pela ATZ em embriões de *Gallus gallus*. Apesar disso, diversos trabalhos já investigaram a presença de ATZ e outros compostos em ovos e tecidos de galinhas, utilizando métodos analíticos robustos.

Tabela 1 - Parâmetros de validação analítica do método de análise de ATZ, DIA e DEA utilizando QuEChERS e HPLC-DAD

Parâmetros	ATZ	DIA	DEA
Tempo de retenção (min)	19,8	13,0	15,1
Faixa de concentração (µg/L)	25-300	25-300	25-300

Parâmetros	ATZ	DIA	DEA	
Equação da reta	$y = 2,65 \times 10^{-3}x + 0,0206$	$y = 8,70 \times 10^{-4}x - 0,0183$	$y = 2,89 \times 10^{-3}x - 0,0382$	
Coefficiente de determinação (R^2)	0,997	0,991	0,999	
LD ($\mu\text{g/L}$)	5	11	7	
LQ ($\mu\text{g/L}$)	16	25	22	
Repetibilidade (DPR %)	Mínimo 25 $\mu\text{g/L}$	6,15	13,17	18,43
	Médio 100 $\mu\text{g/L}$	3,74	10,73	11,02
	Alto 300 $\mu\text{g/L}$	1,55	6,17	2,56

*LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Dados da Pesquisa

Wang *et al.* (2025) desenvolveram um método baseado em QuEChERS acoplado à UPLC-MS/MS para a análise simultânea de 107 resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários em ovos de galinha, alcançando LQ para ATZ de 0,3 $\mu\text{g/kg}$ e desvios padrões inferiores a 10%. Já Filigenzi *et al.* (2019) combinaram a técnica QuEChERS com LC-HRMS para detectar pesticidas em tecidos aviários, obtendo LQs entre 0,75 ng/g e 3,6 ng/g, LDs de 0,25 ng/g a 1,2 ng/g e desvios percentuais relativos (DPR) inferiores a 20%.

Tais evidências demonstram que, embora não existam estudos específicos sobre embriotoxicidade induzida por ATZ, os parâmetros analíticos obtidos no presente trabalho com LDs de 5, 11 e 7 $\mu\text{g/L}$ e LQs de 16, 25 e 22 $\mu\text{g/L}$ para a ATZ, DIA e DEA respectivamente, assim como uma precisão e repetibilidade inferiores a 20% (Tabela 1) estão conforme as normas do INMETRO e atendem aos critérios de aceitação estabelecidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2023), destacando o método como válido para a avaliação dos efeitos da ATZ em embriões de *Gallus gallus*.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas dos grupos controle e branco. A análise dos cromatogramas dos grupos expostos à ATZ (500 e 1.000 $\mu\text{g/L}$) não revelou picos definidos nos tempos de retenção esperados para a ATZ ou seus principais metabólitos. Além disso, a comparação com o grupo controle não indicou diferenças significativas nos níveis de ruído. Esses resultados sugerem a ausência de ATZ e de seus metabólitos nas amostras analisadas, impossibilitando confirmar se houve absorção da substância pelos embriões ou se ela foi metabolizada, por exemplo, nas formas de DEA ou DIA.

A ausência de picos correspondentes à ATZ e aos seus metabólitos nas amostras biológicas pode estar relacionada às características do delineamento experimental adotado. Estudos prévios indicam que a bioacumulação de atrazina ocorre predominantemente sob condições de exposição subcrônica ou crônica, com acúmulo progressivo ao longo do tempo em diferentes modelos biológicos, como pei-

xes, plantas e aves (PREEZ; VUREN, 1992; REINDL *et al.*, 2015; PÉREZ *et al.*, 2022). Nesse contexto, a exposição aguda *in ovo* utilizada no presente estudo pode não ter sido suficiente para promover níveis detectáveis de bioacumulação nos embriões. Além disso, a literatura demonstra que a detecção de baixas concentrações de DIA e DEA em matrizes biológicas complexas frequentemente requer técnicas analíticas de maior sensibilidade, como LC-MS/MS ou LC-HRMS, capazes de atingir limites de quantificação significativamente inferiores aos obtidos por HPLC-DAD (FILIGENZI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2025). Assim, embora o método desenvolvido apresente desempenho analítico adequado e esteja validado segundo critérios do INMETRO e AOAC, a não detecção dos analitos pode refletir limitações biológicas e instrumentais inerentes às condições experimentais adotadas.

Apesar dos resultados encontrados, é importante ressaltar que o modelo piloto foi de suma importância para a continuação da metodologia, uma vez que apesar do método QuEChERS já ter sido realizada em ovos de galinha (NHO-EUL *et al.*, 2019), a metodologia ainda não havia sido testada diretamente em embriões segundo a literatura consultada. Isso implicou, por exemplo, a 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 por meio 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* (ANASTASIADES *et al.*, 2003; PÁEZ; MAARTÍNEZ, 2015). Em contrapartida, a água afeta a eficácia do processo ao solubilizar os agrotóxicos que possuem propriedades de alta solubilidade em água, como no caso da ATZ, interferindo na recuperação do analito.

4 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi verificado que o tratamento agudo de ovos de *Gallus gallus* com 500 µg/L de ATZ não resultou em alterações nas taxas de mortalidade, malformação, peso ou estágio de desenvolvimento dos embriões. Adicionalmente, foi realizada a validação de uma metodologia para quantificar ATZ, DIA e DEA em embriões de galinha, utilizando o método QuEChERS combinado com HPLC-DAD. O método desenvolvido apresenta baixo custo e possibilita um preparo eficiente das amostras. Os baixos valores de LD e LQ obtidos viabilizaram a aplicação da metodologia em ensaios biológicos.

No entanto, não foi possível detectar os analitos ATZ, DIA e DEA em nenhum dos grupos tratados. Tal resultado pode ser atribuído a diversas possibilidades, incluindo a hipótese de que as concentrações utilizadas ainda sejam insuficientes para provocar bioacumulação, ou mesmo a possibilidade de que embriões de *Gallus gallus* não bioacumulem ATZ.

Este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento sobre a detecção de agrotóxicos em embriões de aves. Considerando que as informações sobre intoxicação animal na fase de desenvolvimento embrionário são ainda escassas, torna-se fundamental a realização de estudos adicionais que certifiquem a segurança dos compostos químicos presentes no ambiente, bem como identifiquem potenciais riscos a que esses animais e todo o ecossistema podem estar expostos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001, Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Governo do Estado do Paraná/SETI (EDITAL N° 191/2021/PRPPG), à Universidade Federal da Integração Latino Americana pelo apoio financeiro mediante a bolsa PROBIU e ao Grupo de Pesquisa LEIMAA.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. *et al.* Teratogenic effects of chlorantraniliprole on chick embryos (*Gallus gallus domesticus*). **Indian J Anim Res**, v. 52, n. 5, p. 669-673, 2018.
- ALY, N.M. *et al.* Biochemical targets of chick embryos affected by sub-lethal concentrations of lambda-cyhalothrin and Imidacloprid. **Res Vet Sci**, v. 184, p. 105538, 2025.
- 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. **J AOAC Int**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 22nd ed. Gaithersburg: Oxford University Press, 2023.
- ARCAIN B.M.S. *et al.* Embryotoxic effects of Rovral® for early chicken (*Gallus gallus*) development. **J Toxicol Environ Health A**, v. 84, n. 15, p. 632-648, 2021.
- BARR, D.B. *et al.* Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 10, p. 1474-1478, 2007.
- BOJARSKI, B. *et al.* Effects of embryonic cadmium exposure on erythrocyte indices and morphology in newly hatched *Gallus gallus domesticus* chicks. **Poultry Sci**, v. 101, n. 6, p. 101862, 2022.
- BRINGOLF, R.B. *et al.* Acute and chronic toxicity of technical grade pesticides to glochidia and juveniles of freshwater mussels (unionidae), **Environ Toxicol Chem**, v. 26, n. 10, p. 2086-2093, 2007.
- 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 Sci**, v. 102, n. 2, p. 102413, 2023.

BURKEN, J.G.; SCHNOOR, J.L. Uptake and metabolism of Atrazine by poplar trees. **Environ Sci Technol**, v. 31, n. 5, p. 1399–1406, 1997.

CABRAL, E.R.; DI BERNARDO, L. Presença e remoção de atrazina, desetilatraxina, desisopropilatraxina e desetilhidroxiatraxina em instalação piloto de ozonização e filtração lenta. **Eng Sanit Ambient**, v. 22, 2017.

DONNA, A. *et al.* Carcinogenicity testing of atrazine: preliminary report on a 13-month study on male Swiss albino mice treated by intraperitoneal administration. **G Ital Med Lav**, v. 8, n. 3-4, p. 119–121, 1986.

FILIGENZI, M.S. *et al.* Quantitation of neonicotinoid insecticides, plus qualitative screening for other xenobiotics, in small-mass avian tissue samples using UHPLC high-resolution mass spectrometry. **J Vet Diagn Invest**, v. 31, n. 3, p. 399-407, 2019.

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

FRY, D.M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. **Environ Health Perspect**, 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. **Microchem J**, v. 168, p. 106392–106392, 2021.

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

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L.A. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. **Dev Dyn**, v. 195, n. 4, p. 231–272, 1992.

HANSEN, A.M. *et al.* Atrazina: Un herbicida polémico. **Rev Int Contam Amb**, v. 29, p. 65–84, 2013.

HONG, J. *et al.* Degradation of residual herbicide atrazine in agri-food and washing water. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2416, 2022.

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. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre a validade técnica dos resultados de ensaios**. Rio de Janeiro: INMETRO. 2020.

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

JIAO, Y. *et al.* Okadaic acid exposure induced neural tube defects in chicken (*Gallus gallus*) embryos. **Mar Drugs**, v. 19, n. 6, p. 322, 2021.

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

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

LI, H. *et al.* Terbutylazine exposure induces innate immune response and inflammation through activating cGAS-STING/NF- κ B pathway in myocardium of broiler chicken (*Gallus gallus*). **Pestic Biochem Physiol**, v. 197, 2023.

MALLMANN, A.O. *et al.* Influência da qualidade micotoxicológica e nutricional de híbridos de milho no custo da ração de frangos de corte. **Arq Bras Med Vet Zoo**, v. 71, p. 1659–1668, 2019.

MANDAL, A., *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of tributyltin in the early embryonic chick, *Gallus gallus domesticus*. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 889, p. 503656, 2023.

MATSUSHITA, S. *et al.* Effects of *in ovo* exposure to Imazalil and atrazine on sexual differentiation in chick gonads. **Poultry Sci**, v. 85, n. 9, p. 1641–1647, 2006.

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.

NHO-EUL, C. *et al.* Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Food Chem**, v. 298, 2019.

NOGUEIRA, O.M.N. *et al.* Isolation of marine-derived filamentous fungi and their potential application for bioremediation process. **Braz J Microbiol**, v. 55, n. 4, p. 3403–3412, 2024.

OZGUR, G. *et al.* Determination of more than 500 pesticide residues in hen eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). **Food Sci Anim Resour**, v. 41, n. 5, p. 816-825, 2021.

PÁEZ, M.; MARTÍNEZ, J. Implementación de la metodología QuEChERS en el análisis de residuos de plaguicidas en maíz blanco (*Zea mays*). **Temas Agrar**, v. 20, p. 30-42, 2015.

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.

PREEZ, H. H. D.; VUREN, J. H. J. V. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 101, n. 3, p. 651-655, 1992.

RATNAIKE, R.N. Acute and chronic arsenic toxicity, **Postgrad Med J**, v. 79, n. 933, p. 391-396, 2003.

REINDL, A.R. *et al.* Chlorinated herbicides in fish, birds and mammals in the Baltic Sea. **Water Air Soil Pollut**, v. 226, n. 8, e276, 2015.

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

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

ROSTAMI, S. *et al.* Current methods and technologies for degradation of atrazine in contaminated soil and water: A review. **Environ Technol Innov**, v. 24, p. 102019, 2021.

SCALISI, E.M. *et al.* Toxicity assessment of two-dimensional nanomaterials molybdenum disulfide in *Gallus gallus domesticus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 200, p. 110772, 2020.

SHARMA, S. *et al.* A combination insecticide at sub-lethal dose debilitated the expression pattern of crucial signalling molecules that facilitate craniofacial patterning in domestic chick *Gallus domesticus*. **Neurotoxicol Teratol**, v. 76, e106836, 2019.

SLÁMOVÁ, T. *et al.* Application of QuEChERS-EMR-Lipid-DLLME method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food of animal origin. **J Food Compos Anal**, v. 87, p. 103420, 2020.

SMITH, P.N. *et al.* Assessment of risks to listed species from the use of atrazine in the USA: a perspective. **J Toxicol Environ Health B**, v. 24, n. 6, p. 223-306, 2021.

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

UTZIG, I. L. J. *et al.* Estudo dos efeitos da atrazina sobre o desenvolvimento embrionário de aves. **Rev Multidiscip Educ Meio Amb**, v. 2, n. 1, p. 9, 2021.

VILCHES-MOURE, J. G. Embryonic chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a model of cardiac biology and development. **Comparative Med**, v. 69, n. 3, p. 184–203, 2019.

WANG, X. *et al.* QuEChERS combined with emulsification-demulsification clean-up for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in eggs by UPLC-MS/MS. **Microchem J**, v. 214, 2025.

WILHELMS, K.W. *et al.* Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: studies in male Japanese quail. **Toxicol Sci**, v. 86, n. 1, p. 152–160, 2005.

YANG, J. *et al.* Acute and chronic toxicity of binary mixtures of bisphenol A and heavy metals. **Toxics**, v. 10, n. 5, p. 2552022, 2022.

Recebido em: 29 de Julho de 2025
Avaliado em: 7 de Fevereiro de 2026
Aceito em: 17 de Março de 2026



**A autenticidade desse artigo
pode ser conferida no site
<https://periodicos.set.edu.br>**

1 Graduado em Biotecnologia. Universidade Federal da Integração Latino Americana - UNILA, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0009-0005-6992-7255. E-mail: gustavo88.franca@gmail.com

2 Química, Mestre em Energia & Sustentabilidade. Universidade Federal da Integração Latino Americana - UNILA, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0000-0001-9801-5857.
E-mail: luanaknaul16@gmail.com

3 Graduada em Tecnologia em Saneamento Ambiental, Mestre em Energia & Sustentabilidade. Universidade Federal da Integração Latino Americana - UNILA, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0009-0004-4412-5507.
E-mail: angierociobarreracontreras@gmail.com

4 Bióloga, Mestre em Biotecnologia. Itaipu Parquetec, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0000-0001-7107-366X.
E-mail: beatrizarcain@hotmail.com.

5 Bióloga, Doutora em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Federal da Integração Latino Americana - UNILA, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0000-0003-2324-4414.
E-mail: carla.grade@unila.edu.br.

6 Química. Doutora em Química. Universidade Federal da Integração Latino Americana - UNILA, Foz do Iguaçu, PR. Brasil. ORCID 0000-0003-1621-5199. E-mail: marcela.boroski@unila.edu.br e marcelaboroski@yahoo.com.br

Copyright (c) 2026 Revista Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente



Este trabalho está licenciado sob uma licença Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.