

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA DL₅₀ EM LARVAS DE *Tenebrio molitor* UTILIZANDO ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS COMO REFERÊNCIA PARA TRIAGEM DE NOVOS COMPOSTOS

OPTIMIZATION OF A PROTOCOL FOR THE EVALUATION OF LD₅₀ IN *Tenebrio molitor* LARVARS USING COMMERCIAL ANTIFUNGALS AS A REFERENCE FOR THE TRIAL OF NEW COMPOUNDS

OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA DL₅₀ EN *Tenebrio molitor* LARVARS UTILIZANDO ANTIHONGOS COMERCIALES COMO REFERENCIA PARA EL ENSAYO DE NUEVOS COMPUESTOS

Natália Mestre Braz

Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, Brasil.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, Brasil.

Melyssa Negri

Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, Brasil.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, Brasil.

RESUMO: A crescente demanda por metodologias éticas, econômicas e sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento e a validação de modelos alternativos ao uso de animais em experimentação científica. Nesse contexto, o princípio dos 3Rs (redução, substituição e refinamento), consolidou-se como diretriz fundamental, sendo adotado pelas principais legislações regulatórias como a Lei Arouca no Brasil e as diretrizes da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). Foram discutidos os marcos históricos e a evolução normativa dos métodos alternativos, bem como os modelos disponíveis *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. O presente estudo teve como objetivo otimizar um protocolo de determinação da dose letal mediana (DL50) utilizando larvas de *Tenebrio molitor* expostas a antifúngicos comerciais, empregados neste trabalho como substância-modelo. Destaca-se o uso de *T. molitor* como modelo experimental promissor devido à sua praticidade de manejo, baixo custo, robustez imunológica e similaridades fisiológicas com vertebrados. Também foi abordada a toxicidade dos fármacos anfotericina B, caspofungina e itraconazol considerando seus mecanismos de ação, espectro terapêutico e efeitos adversos. A adaptação do protocolo experimental baseado em Brai et al. (2023) visa estabelecer uma ferramenta eficaz e reproduzível para triagens toxicológicas preliminares, possibilitando sua futura aplicação na avaliação da toxicidade de novos compostos com potencial terapêutico. Os resultados indicaram uma DL50 de 750 mg/kg para os três antifúngicos testados, sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). Essa abordagem contribui para o avanço de estratégias pré-clínicas mais éticas, confiáveis e acessíveis, fortalecendo o uso de modelos alternativos na pesquisa científica.

Palavras-chave: *Tenebrio*. Dose letal mediana. Antifúngicos. Testes de toxicidade.

ABSTRACT: The growing demand for ethical, economical and sustainable methodologies has driven the development and validation of alternative models to the use of animals in scientific experimentation. In this context, the principle of the 3Rs (reduction, replacement and refinement) has become a fundamental

guideline and has been adopted by the main regulatory legislations, such as the Arouca Law in Brazil and the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) guidelines. The historical milestones and regulatory evolution of alternative methods were discussed, as well as the available in vitro, in silico and in vivo models. The aim of this study was to optimize a protocol for determining the median lethal dose (LD50) using *Tenebrio molitor* larvae exposed to commercial antifungals, used in this work as a model substance. We highlight the use of *T. molitor* as a promising experimental model due to its practical handling, low cost, immunological robustness and physiological similarities to vertebrates. The toxicity of the drugs amphotericin B, caspofungin and itraconazole was also addressed, considering their mechanisms of action, therapeutic spectrum and adverse effects. The adaptation of the experimental protocol based on Brai et al. (2023) aims to establish an effective and reproducible tool for preliminary toxicological screening, enabling its future application in assessing the toxicity of new compounds with therapeutic potential. The results indicated a LD50 of 750 mg/kg for the three antifungals tested, with no statistically significant difference between them ($p > 0.05$). This approach contributes to the advancement of more ethical, reliable and accessible preclinical strategies, strengthening the use of alternative models in scientific research.

Keywords: *Tenebrio*. Median lethal dose. Antifungals. Toxicity tests.

RESUMEN: La creciente demanda de metodologías éticas, económicas y sostenibles ha impulsado el desarrollo y la validación de modelos alternativos al uso de animales en la experimentación científica. En este contexto, el principio de las 3R (reducción, sustitución y refinamiento) se ha convertido en una directriz fundamental y ha sido adoptado por las principales legislaciones reguladoras, como la Ley Arouca en Brasil y las directrices de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico). Se discutieron los hitos históricos y la evolución normativa de los métodos alternativos, así como los modelos in vitro, in silico e in vivo disponibles. El objetivo de este estudio era optimizar un protocolo para determinar la dosis letal media (DL50) utilizando larvas de *Tenebrio molitor* expuestas a antifúngicos comerciales, utilizados en este trabajo como sustancia modelo. Destacamos el uso de *T. molitor* como modelo experimental prometedor debido a su practicidad de manejo, bajo coste, robustez inmunológica y similitudes fisiológicas con los vertebrados. También se analizó la toxicidad de los fármacos anfotericina B, caspofungina e itraconazol, teniendo en cuenta sus mecanismos de acción, espectro terapéutico y efectos adversos. La adaptación del protocolo experimental basado en Brai et al. (2023) pretende establecer una herramienta eficaz y reproducible para el cribado toxicológico preliminar, permitiendo su futura aplicación en la evaluación de la toxicidad de nuevos compuestos con potencial terapéutico. Los resultados indicaron una DL50 de 750 mg/kg para los tres antifúngicos ensayados, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$). Este enfoque contribuye al avance de estrategias preclínicas más éticas, fiables y accesibles, reforzando el uso de modelos alternativos en la investigación científica.

Palabras clave: *Tenebrio*. Dosis letal media. Antifúngicos. Pruebas de toxicidad.

1 MARCOS HISTÓRICOS DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

Nos últimos anos, a comunidade científica tem buscado incessantemente por métodos inovadores, éticos e legais para o uso consciente de animais em laboratório. Essa abordagem foi primeiramente descrita por Russel-Burch em 1959, conhecido como o princípio dos 3Rs, a substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e o refinamento (*refinement*) do uso de animais em experimentação científica (RUSSEL & BURCH, 1992; PEDRO, 2021). A publicação oficial sobre os 3Rs, que representa um marco de evolução da ciência, aconteceu somente na década de 1980 na Europa por meio da Directiva 86/906/EEC que estabelece leis de proteção ao uso de animais em experimentos. A partir deste fato, alguns países como a Itália (*European Center for Validation of Alternative Methods – ECVAM*), os Estados Unidos (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM*), a Inglaterra (*Fund for Replacement of Animal Medical Experiments - FRAME*), entre outros, formaram centros de pesquisa dedicados a validação de métodos alternativos, bem como a criação de base de dados, desenvolvimento de projetos de pesquisas, promoção de discussões e parceria com outras instituições apoiadoras (ABREU et al., 2008).

A legislação brasileira também avançou nesse aspecto. Promulgada em 2008, a Lei Arouca 11.794/08, estabeleceu normas para o uso científico de animais no Brasil, visando garantir a proteção e o bem-estar promovendo a substituição pelos métodos alternativos sempre que possível (BRASIL, 2008). A partir dela foi fundado, no mesmo ano, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, integrante do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações e Comunicações - MCTI, responsável por regulamentar, estabelecer normas e diretrizes éticas que envolvam o uso e cuidado com animais para ensino e pesquisa em todo país. Cabe ainda ao CONCEA, orientar técnicas de instalação e funcionamento de biotérios, manipulação de animais e gerenciar registros de estudos realizados e em andamento juntamente com as Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs (BRASIL, 2009).

Em 2012, foi criado uma Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais – RENAMA, que desempenha um papel fundamental na disseminação, validação e conscientização dos métodos alternativos inspirados na filosofia dos 3Rs para testes de segurança e eficácia de medicamentos e cosméticos. O RENAMA é composto por diversas instituições importantes como INMETRO, ANVISA, INCQS, LNBio, BraCVAM, CNPq, ABDI e CONCEA. Essa composição diversificada possibilita a colaboração de diferentes esferas e organizações, promovendo discussão e progresso dos métodos alternativos no cenário científico nacional (PEDRO; BENTO, 2023; MCTI, 2024).

Em 2019 tornou-se obrigatório a substituição dos métodos originais pelos alternativos (CONCEA, 2014b; DISNER; EBERLIN et al., 2019) e atualmente, o Brasil disponibiliza um rol de 41 técnicas reconhecidas pelo CONCEA a partir da publicação de resoluções normativas (RNs), sendo a mais recente a RN n.º 56, de 05 de outubro de 2022 (CONCEA, 2022; PEDRO; BENTO, 2023). Os métodos citados nessas resoluções são reconhecidos internacionalmente pela *Organization for Economic Cooperation and Development – OECD*, uma organização intergovernamental que promove políticas

que melhoram o bem-estar econômico e social em todo o mundo. Nesse contexto, o BraCVAM - Centro Brasileiro de Validação dos Métodos Alternativos dedica-se a seguir os padrões internacionais de validação para garantir credibilidade e aceitação no cenário científico, propõe e avalia protocolos entre outras tantas atividades (BRACVAM, 2024).

Essa realidade tem sido desafiadora para a ciência atual devido à complexidade de implementação, capacitação e difusão dessas diretrizes e protocolos. Pensando nisso, a Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais em Experimentação – PreMASUL, criada em 2015 pelo MCTI, passou a oferecer cursos para qualificação de profissionais sobre os métodos alternativos e difundir o conceito dos 3Rs (DISNER, 2019).

Em 2023, o CONCEA lançou o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (CONCEA, 2023), para ajudar instituições a entenderem os requisitos mínimos de instalações que abrigam animais usados em experimentos. Aborda temas como cuidados, manejos, critérios obrigatórios e recomendados para cada grupo taxonômico. Publicou também, em 20 de maio de 2024, uma Nota Informativa nº01/2024 na qual considera diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais em pesquisa e ensino durante as fases embrionárias, fetal e larval e todos os projetos e planos devem ser submetidos às CEUAs para registro, garantindo o tratamento ético e humano dos animais em questão (CONCEA, 2024). A Figura 1 ilustra a linha do tempo dos principais marcos e da evolução da instituição dos métodos alternativos nas políticas públicas.

Figura 1. Linha do tempo dos principais marcos da implantação dos métodos alternativos (1959 – 2024).



Fonte: do autor.

2 O PRINCÍPIO DOS 3Rs

O Brasil tem se destacado como um dos maiores no mercado de cosméticos e fármacos do mundo ocupando o terceiro lugar no ranking mundial de consumo de produtos cosméticos e também no ranking de países que mais lançam produtos anualmente (ABIHPEC, 2023). Com o progresso no desenvolvimento de novas formulações, tem-se aumentado as pesquisas sobre a eficácia e segurança desses produtos (EBERLIN et al., 2019). Os modelos animais são amplamente utilizados em

experimentos há bastante tempo, mas seu uso tem gerado inúmeras críticas à comunidade científica, exigindo que autoridades busquem alternativas éticas e que promovam o bem-estar animal (DISNER, 2019).

Neste contexto, o princípio dos 3Rs tem conquistado cada vez mais espaço, propondo a redução, substituição e o refinamento do uso de animais em pesquisas, alinhando-se a práticas mais responsáveis e inovadoras. Este princípio é considerado essencial para a realização de uma ciência de alta qualidade, tanto no meio acadêmico como no industrial (EBERLIN et al., 2019). Por isso, é importante compreender cada um de seus componentes: a redução, se refere à diminuição do número de animais utilizados nas pesquisas; a substituição, busca alternativas que eliminem completamente o uso de animais; e o refinamento, envolve a melhoria das práticas experimentais para minimizar o sofrimento dos animais quando seu uso é necessário (MACARTHUR CLARK, 2018).

Na obra de Macarthur Clark (2018), é apresentada uma abordagem contemporânea baseada na aplicação dos 3Rs, conforme descrito por Tannenbaum e Bennett (2015), destacando os avanços tecnológicos e ressaltando os benefícios tanto para a pesquisa científica quanto para o bem-estar dos animais. Essa nova perspectiva busca transcender a visão puramente ética dos 3Rs, que antes eram vistos como uma obrigação. Ao abordar esses princípios de forma dinâmica, o autor argumenta que eles se tornam mais relevantes e atraentes para os cientistas, enfatizando que as definições originais ainda possuem grande valor (MACARTHUR CLARK, 2018). Além disso, aponta que é necessário um equilíbrio adequado entre os aspectos clássicos e os modernos para garantir a confiança pública de que a pesquisa em animais é ética e está sendo realizada com responsabilidade (Tabela. 1).

Tabela 1. Comparação entre os princípios clássicos propostos por Russel – Burch e as perspectivas modernas.

	Princípios Clássicos	Perspectivas Modernas
Redução	Diminuição da quantidade de animais em experimento.	Conduzir estudos em animais com planejamento rigoroso para garantir resultados consistentes e reproduzíveis.
Substituição	Busca por métodos alternativos que eliminem completamente a utilização de animais em pesquisas.	Acelerar o uso de tecnologias inovadoras para criar modelos e ferramentas preditivas sem utilizar animais.
Refinamento	Melhoria das técnicas experimentais para reduzir o sofrimento dos animais quando seu uso é necessário.	Aplicação de novas tecnologias <i>in vivo</i> que promovam o bem-estar animal e melhorias nos cuidados, alojamento e manejo.

Adaptado de Macarthur Clark, 2018.

3 PROCESSO DE APROVAÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS E COSMÉTICOS

De acordo com a ANVISA, medicamentos são produtos farmacêuticos desenvolvidos em laboratórios com finalidades preventivas, curativas, paliativas ou diagnósticas. Cosméticos, por sua vez, são produtos de higiene pessoal destinados a limpar, perfumar ou modificar a aparência (ANVISA, 2005). São constituídos por substâncias naturais, sintéticas ou misturas de uso externo ou interno no

corpo humano. Ambos os tipos de produtos são submetidos a rigorosos processos de avaliação de segurança e eficácia antes de sua disponibilização no mercado (ANVISA, 2024).

A ANVISA, como órgão regulador e fiscalizador, disponibiliza documentos orientadores em seu *site*, como o "Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos" (BRASIL, 2013) e o "Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos", que detalham as etapas de avaliação, os critérios de segurança e os riscos potenciais associados a esses produtos (BRASIL, 2012).

O processo de desenvolvimento e aprovação de um fármaco é longo e complexo. Inicialmente, busca-se identificar novas substâncias terapêuticas e alvos moleculares, seguido pela triagem de compostos com potencial de interação (DEORE et al., 2019). Posteriormente, realiza-se a otimização química visando minimizar efeitos colaterais e aprimorar a eficácia do produto. Um aspecto fundamental nessa fase é a análise dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (MADDEN et al., 2020).

Nesse contexto, ferramentas *in silico* vêm sendo amplamente utilizadas como complemento às abordagens tradicionais. Esses *softwares* permitem a previsão de propriedades físico-químicas, farmacológicas e toxicológicas de candidatos promissores, facilitando a seleção de compostos com maior potencial terapêutico para posterior validação experimental (MARCOMINI; NEGRI, 2023).

Além disso, os parâmetros de toxicidade dos compostos são classificados conforme o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), criado pela Organização das Nações Unidas (ONU). O objetivo do GHS é promover a segurança no manuseio e armazenamento de substâncias químicas, minimizando os riscos à saúde humana e ao meio ambiente (GHS, 2024). A classificação toxicológica é baseada na determinação da dose letal mediana (DL50), que corresponde à dose de uma substância capaz de causar morte em metade de uma população experimental exposta (ZBINDEN; FLURY- ROVERSI, 1981). De acordo com o GHS, as categorias de toxicidade são definidas como: classe I e II, fatal ($DL50 \leq 5$ e ≤ 50 mg/kg); classe III, tóxica ($50 < DL50 \leq 300$ mg/kg); classe IV, prejudicial ($300 < DL50 \leq 2000$ mg/kg); classe V, potencialmente prejudicial se ingerido ($2000 < DL50 \leq 5000$ mg/kg); e classe VI, não tóxico ($DL50 > 5000$ mg/kg). O conhecimento da DL50 é fundamental para definir a margem de segurança e compreender os riscos associados a novos produtos (BANERJEE et al., 2024).

Os estudos pré-clínicos são conduzidos para avaliar a segurança e eficácia em modelos experimentais, precedendo os ensaios clínicos em humanos. Uma vez que o medicamento atende todos os requisitos regulatórios ele pode ser comercializado sob monitoramento contínuo da sua segurança e eficácia (DEORE et al., 2019). Por outro lado, o processo de aprovação dos cosméticos tende a ser mais ágil por serem considerados produtos de baixo risco e menos invasivos, embora também exijam evidências

de segurança. As empresas devem garantir que seus produtos não causarão danos à saúde dos consumidores (BRASIL, 2012).

4 ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA DE NOVOS FÁRMACOS

A avaliação da toxicidade é uma etapa essencial na descoberta de novos medicamentos, pois somente compostos seguros na fase pré-clínica avançam para as fases posteriores. A fase pré-clínica inclui testes de toxicidade *in vitro* que foram adotados para prever potenciais efeitos tóxicos *in vivo*. Recomendados pela ANVISA e pelo CONCEA, esses testes têm como referência modelos alternativos desenvolvidos pela OECD (SINGH, 2018; BRAI et al., 2023). Dentre os estudos não clínicos destacam-se os testes de toxicidade aguda; toxicidade repetida; potencial de irritação e corrosão de tecidos (dérmicos, mucosas e ocular); toxicidade do desenvolvimento e reprodução; genotoxicidade; carcinogenicidade; tolerância local; sensibilização cutânea; absorção/penetração cutânea; fototoxicidade; toxicocinética e toxicodinâmica (Anexo 1) (MORETTO; STEPHANO, 2019).

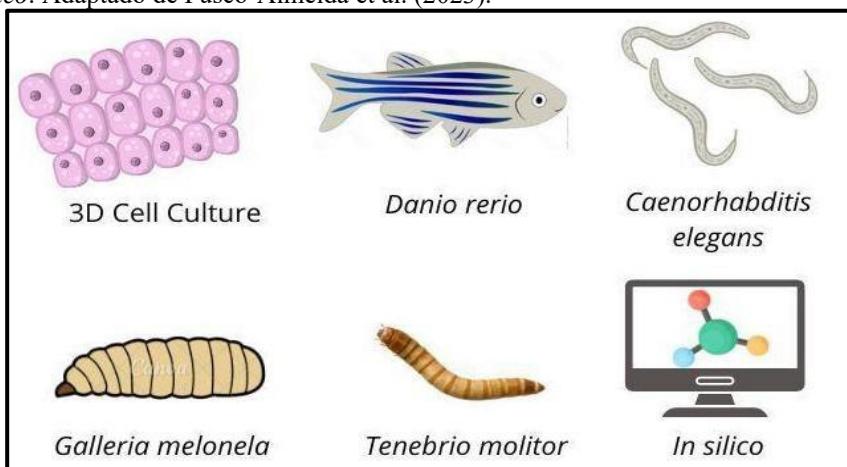
Segundo Presgrave (2002), não é viável substituir todos os ensaios que usam animais, como, por exemplo, em áreas de aprendizagem e memória. Ele enfatiza que a substituição deve acontecer apenas quando as alternativas estiverem bem definidas e validadas, garantindo que esses métodos possam indicar, com precisão, a eficácia e segurança de substâncias ou produtos.

Dessa forma, os métodos alternativos aos ensaios tradicionais com animais representam um avanço significativo no campo da toxicologia pré-clínica. Eles não apenas reduzem a utilização de animais, mas também oferecem abordagens mais rápidas e economicamente viáveis, mantendo a confiabilidade e a segurança necessária para a validação de novos fármacos. A implementação contínua e o aprimoramento desses modelos, alinhados às regulamentações disponíveis, são fundamentais para o desenvolvimento de compostos terapêuticos mais seguros e éticos (CONCEA, 2023).

5 PRINCIPAIS MODELOS ALTERNATIVOS

A busca por métodos alternativos tem fornecido resultados precisos e relevantes sem causar sofrimento aos animais. Modelos celulares, computacionais, tecidos humanos e invertebrados são algumas das metodologias que estão sendo exploradas com sucesso (Figura 2). Além de atender às preocupações éticas, os modelos alternativos apresentam inúmeras vantagens para a ciência, como redução de custos, rapidez nos resultados e estudo do metabolismo humano com sistema similar. Portanto, a adoção dessas alternativas vem sendo o reflexo da ciência moderna em busca de experimentos mais eficientes, seguros e reproduzíveis garantindo o conhecimento sem comprometer a integridade animal (TADICH; TARAZONA, 2023).

Figura 2. Principais modelos alternativos ao uso de animais em experimentação. São observados cultura de células 3D, *Danio rerio* (peixe-zebra), *Caenorhabditis elegans* (nematoide), larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* e modelos computacionais *in silico*. Adaptado de Fusco-Almeida et al. (2023).



As culturas celulares bidimensionais (2D) são amplamente utilizadas por sua simplicidade e facilidade de execução, com as células se desenvolvendo em uma superfície plana formando uma monocamada. Apesar de não refletir adequadamente um organismo *in vivo*, esse modelo fornece dados importantes sobre toxicidade, medicamentos, metabolismo e interações entre patógenos e hospedeiros (ZINGALES et al., 2023). Em contrapartida, as culturas celulares tridimensionais (3D) possuem células mais diferenciadas e melhor representação do organismo, permitindo interações mais realistas entre células, matriz extracelular e outras relações fisiológicas. Esse modelo vem sendo bastante promissor na pesquisa de novos fármacos e testes de toxicidade, promovendo uma avaliação mais precisa da segurança e eficácia dos compostos, simulando um organismo real (DOS SANTOS et al., 2023).

Os estudos *in silico* são simulações computacionais que complementam experimentos científicos. Considerado também um modelo alternativo, essa metodologia vem crescendo com os avanços tecnológicos (CHANG et al., 2022). Os softwares simulam propriedades físico-químicas baseadas em algoritmos que permitem prever com maior precisão interações moleculares, comportamento de proteínas, efeitos de novos fármacos e a toxicologia de compostos químicos. Este método promete revolucionar a forma como a ciência é conduzida, possibilitando a compreensão de processos biológicos a nível molecular e acelerando o desenvolvimento de novas pesquisas (ALVES; STREIT; PIZZOLATO, 2023).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) se destaca como um modelo alternativo valioso em pesquisas biomédicas devido à similaridade funcional de 70% com genes causadores de doenças em humanos, além de outras semelhanças genéticas e fisiológicas. Ele é amplamente utilizado em estudos micológicos na investigação das interações entre patógeno-hospedeiro. O peixe-zebra é uma forte ferramenta pré-clínica *in vivo* para avaliar a toxicidade de uma ampla gama de medicamentos e seus efeitos nocivos, permitindo uma detecção rápida e um monitoramento confiável dos efeitos tóxicos. Além disso, se consolidou como um modelo poderoso para investigar distúrbios hepáticos especialmente na triagem de

medicamentos hepatoprotetores. Sua transparência possibilita a visualização direta de interações celulares e respostas imunológicas em tempo real (KATOCH; PATIAL, 2021).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* é outro modelo utilizado em testes de toxicidade devido ao seu curto ciclo de vida, que proporciona vantagens significativas em experimentos. Com 80% de seus genes semelhantes aos mamíferos, esse verme possui uma genética bem estabelecida (GÖETHEL et al., 2022). Ele é considerado o modelo pioneiro na avaliação de interações patógeno-hospedeiro, especialmente em estudos com fungos patogênicos e cepas multirresistentes. O *C. elegans* tem se mostrado eficaz na triagem de novos antifúngicos, com publicações reconhecendo sua utilidade no desenvolvimento de fármacos. Além de ser de fácil manejo, proporciona resultados rápidos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica como a DL50. Também permite a avaliação de compostos que modulam a imunidade inata, fatores de virulência (biofilmes e *quorum sensing*), neurotoxicidade, espécies reativas de oxigênio (ROS) e expressão gênica de enzimas antioxidantes (HUNT, 2017; FUSCO-ALMEIDA et al., 2023). Com relação a modelos invertebrados, a *Galleria mellonella* se destaca como um modelo *in vivo* bastante conceituado. Conhecida como traça da cera, essa larva reflete a complexidade do organismo de mamíferos em experimentos, reforçando a necessidade de reduzir o uso de animais em estágios iniciais da pesquisa SINGKUM et al., 2019). Sua utilização é flexível e simples, dispensando a aprovação do comitê de ética. A semelhança do sistema imunológico inato das larvas com o sistema imunológico de mamíferos tem sido a base para diversos estudos como: investigação dos mecanismos da patogenicidade de microrganismos, sobrevivência, DL50, efeitos histopatológicos, alterações nas respostas humorais e celulares e, avaliação da toxicidade de medicamentos (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013). Alguns autores afirmam que a *G. mellonella* pode fornecer resultados mais precisos de compostos de baixa toxicidade do que linhagens celulares e, ainda a considera como um potencial modelo para estudos de toxicidade de nanomateriais (ALLEGRA et al., 2018; SERRANO et al., 2023).

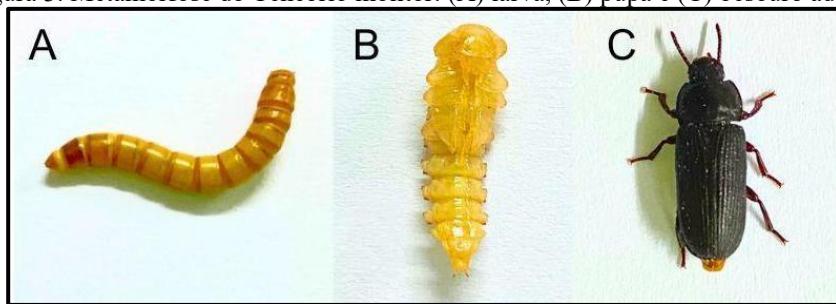
Embora cada modelo tenha suas particularidades, todos desempenham um papel fundamental nas pesquisas científicas. Para potencializar seus benefícios, é importante adotar uma abordagem crítica e analítica, identificando o modelo mais apropriado para cada situação ou pesquisa. Dessa forma, será possível extrair o máximo de informações que o modelo pode oferecer (TADICH; TARAZONA, 2023).

5.1 *TENEBRIO MOLITOR*

T. molitor é conhecido popularmente como besouro-da-farinha, pertencente à ordem Coleoptera e à família Tenebrionidae. Possui importância na agricultura por ser considerado uma praga de grãos armazenados, como o trigo e outros cereais. Preferem ambientes secos, toleram temperaturas de até 37 °C e se alimentam de sementes e farelo de trigo, causando prejuízo aos produtores de grãos (CANTERI DE SOUZA et al., 2018).

O ciclo de vida do *T. molitor* varia entre 280 a 630 dias e envolve quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e besouro, caracterizando-o como inseto holometábolo, ou seja, com metamorfose completa (Figura 3). O inseto possui alto teor de proteínas e nutrientes que permite sua utilização na produção de ração animal, inclusão na dieta humana e fabricação de fertilizantes naturais. Trata-se de uma alternativa saudável, sustentável e segura, que confere versatilidade e relevância em diferentes contextos (RIBEIRO; DE MORAES ALVES; DE MENDONÇA, 2021).

Figura 3. Metamorfose do *Tenebrio molitor*: (A) larva, (B) pupa e (C) besouro adulto.



Fonte: do autor.

A criação do *T. molitor* envolve custos operacionais reduzidos e manejo simplificado, o que tem despertado crescente interesse tanto da indústria quanto da comunidade científica. Essa espécie apresenta vantagens logísticas importantes: suas larvas são menos sensíveis a variações ambientais, fáceis de manipular, requer infraestrutura simples e são mais tolerantes ao jejum, o que facilita a manutenção em condições laboratoriais. A aquisição comercial é amplamente disponível, com ciclo de vida mais longo e estável permitindo maior flexibilidade no planejamento experimental (CANTERI DE SOUZA; DE ALMEIDA, 2016). Diferente das larvas de *G. mellonella* que embora também muito utilizada em experimentos, são mais sensíveis e entram rapidamente em pupação, exigindo controle rigoroso do tempo experimental. Essas vantagens tornam as larvas de *T. molitor* uma alternativa robusta e eficiente, favorecendo o controle experimental, a investigação da interação patógeno-hospedeiro e a realização de estudos mais consistentes e reproduzíveis sobre imunidade e toxicidade (PEREIRA; ROSSI, 2020).

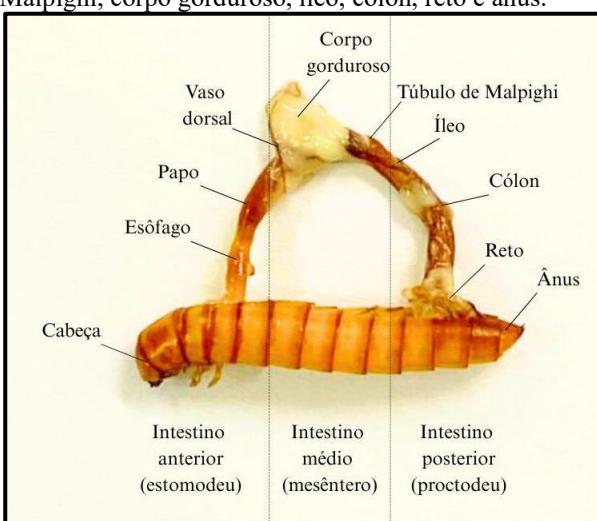
Em 2023, Kaur, Stinson, DiCenzo, publicaram o sequenciamento completo do genoma de *T. molitor*, uma ferramenta essencial para a compreensão de seus processos biológicos, incluindo reprodução, evolução, nutrição e produção de alimentos. O conhecimento sobre sua resistência a doenças e aos estresses ambientais são fundamentais para otimizar seu manejo industrial, especialmente na produção de alimento animal e na promoção da sustentabilidade. Além disso, estudos sobre variabilidade genética e expressão gênica também mostraram-se relevantes (OPPERT et al., 2012). Essa abordagem permite identificar novas espécies e aprimorar os métodos de criação, beneficiando a indústria e impulsionando avanços nas áreas de biotecnologia, conservação e biodiversidade (ELEFTHERIOU et al., 2022).

Do ponto de vista anatômico, as larvas de *T. molitor* possuem um corpo segmentado e adaptado à vida subterrânea e à alimentação contínua. O trato digestivo é dividido em três regiões principais: o intestino anterior (estomodeu), responsável pela ingestão, armazenamento e Trituração do alimento; o intestino médio (mesôntero), onde ocorre a digestão enzimática e a absorção de nutrientes; e o intestino posterior (proctodeu), encarregado da reabsorção de água, sais e outras moléculas, culminando na formação e eliminação das fezes (Figura 4) (VOMMARE et al., 2024). Associado ao mesôntero e ao proctodeu estão os túbulos de Malpighi que desempenham funções excretoras e de osmorregulação, equivalente aos rins nos vertebrados. Outro órgão destaque é o corpo gorduroso, uma estrutura multifuncional que atua no metabolismo energético, na síntese de proteínas e na resposta imune, exercendo funções análogas ao fígado (KESHAVARZ et al., 2020). A versatilidade e o entendimento da anatomia larval têm potencializado sua utilização como modelo experimental, especialmente em testes de toxicidade, metabolismo e imunidade, devido à sua similaridade com organismos vertebrados (KAUR; STINSON; DICENZO, 2023).

Adamski et al (2019), ressaltam que o sistema neuroendócrino e imunológico dos insetos apresenta semelhanças estruturais, funcionais e de desenvolvimento com os vertebrados. Os autores destacam, que muitas moléculas sinalizadoras foram conservadas ao longo da evolução do reino animal, possibilitando estudos comparativos entre vertebrados e invertebrados.

Em pesquisas microbiológicas, o *T. molitor* tem sido utilizado como modelo para estudos de interação entre patógeno-hospedeiro, por ser altamente suscetível a infecções por fungos, principalmente os entomopatogênicos. Sua utilização contribui para o desenvolvimento de biopesticidas e para a compreensão dos mecanismos de virulência e controle de pragas com menor impacto ambiental. No contexto ecológico, *T. molitor* também desempenha papel fundamental na avaliação da ecotoxicidade, sendo utilizado como bioindicador da presença de metais pesados no solo em razão da sua habilidade de metabolizar diferentes substratos e acumular metais tóxicos em seu corpo (melanização) (PEIXOTO; NALIATO; THEODORO, 2024).

Figura 4. Anatomia interna da larva de *Tenebrio molitor*, evidenciando o sistema digestório e estruturas associadas. São observados: cabeça, intestino anterior (*estomodeu*), esôfago, papo, vaso dorsal, intestino médio (*mesêntero*), intestino posterior (*proctodeu*), túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, íleo, cólon, reto e ânus.



Fonte: do autor.

6 LARVAS NA PESQUISA CIENTÍFICA

6.1 SEMELHANÇAS BIOLÓGICAS

A comunidade científica tem, cada vez mais, demonstrado interesse no uso de larvas em suas pesquisas, devido às semelhanças fisiológicas com organismos vertebrados. Essa preferência se deve a vantagens práticas, como facilidade de manipulação, observação, resultados rápidos e baixo custo. Os estudos se concentram nas áreas biomédicas e ambientais, buscando desvendar mecanismos de patogenicidade, doenças, imunidade, processos farmacológicos e toxicológicos de medicamentos e, pesquisa de novos pesticidas (PEIXOTO; NALIATO; THEODORO, 2024).

De acordo com Adamski et al (2019), os insetos compartilham semelhanças fisiológicas com os animais superiores em termos estruturais, funcionais e de desenvolvimento. Os autores destacam várias moléculas sinalizadoras (hormônios) e peptídeos que evidenciam essas similaridades, resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Principais semelhanças fisiológicas entre invertebrados e vertebrados, segundo Adamski et al (2019).

Sistema	Invertebrados	Vertebrados	Função
Neuroendócrino	Células neurosecretoras (NSCs)		Produção de hormônios e neurohormônios para regulação e neuromodulação do sistema neuroendócrino.
	<i>Corpora cardiaca</i> (CC) e <i>Corpora allata</i> (CA)	Glândula pituitária	Armazenam e liberam hormônios produzidos pelas NSCs.
	Hormônios adipocinéticos (AKHs)	Glucagon	Regulação dos níveis de glicose e lipídeos no organismo.
	Peptídeo semelhante à insulina (ILPs)	Insulina	Regulam a homeostase da glicose.
	Peptídeo relacionados a taquicinina (TRPs)	Taquicinina	Modulação da motilidade gastrintestinal e regulação da resposta inflamatória.

Digestório	Sulfacininas (SKs)	Colecistocinina (CCK)	Regulação do consumo de alimentos (saciedade) e metabolismo energético.
	Receptores de SK	Receptores de CCK	Ligam respectivamente as SKs e as CCKs.
	Microvilosidades no intestino médio	Microvilosidades no intestino	Microbiota semelhante faz modulação da toxicidade de substâncias.
Sistema circulatório	Hemolinfa	Sangue	Armazenamento e circulação de nutrientes, defesa imune, excreção.
Cardiovascular	Miossupressinas	RFamidas	Inibição da contratilidade cardíaca.
	Receptores acoplados à proteína G (GPCR)	GPCRs	Transmissão de sinais externos ao interior das células.
	Vaso dorsal	Coração	Responsável pela circulação da hemolinfa.
Metabolismo	Corpo gorduroso	Tecido adiposo e fígado	Armazenamento de lipídeos (energia) e metabolização de substâncias.
	CYP450 e enzimas de conjugação (CYP3A4)	CYP450	Desintoxicação e neutralização de drogas.
Crescimento, reprodução e desenvolvimento	Alatotropinas e alatostatinas (ASTCs)	Somatostatina	Regulação do crescimento e funções endócrinas.
	Receptores ASTC	Receptor de somatostatina SSTR3 humano	Conservação dos mecanismos de sinalização de ambos grupos.
	Peptídeos PISCF*/ASTCs	Somatostatina	Desempenham funções inibitórias em seus organismos.
Diurético	Inotocina	Vasopressina	Osmorregulação, reprodução, comportamento sociais complexos, memória e aprendizagem.
	Receptores de vasopressina		Conservação na função e estrutura dos mecanismos de sinalização.
Imunológico	Reconhecimento de patógenos		Ativação da resposta imune.
	Hemócitos	Leucócitos	Células de defesa do organismo.
	Sinalização Toll, Imd e JAK/STAT		Regulação e coordenação da resposta imune inata.
	Receptor <i>Toll</i>	Receptor <i>Toll-Like</i>	Reconhece padrões moleculares e ativa a produção de mediadores inflamatórios da imunidade inata.
	Fator de transcrição Dif	Fatores de transcrição da família NF-κB	Regulação da resposta imune inata e a inflamação ao ativar genes, modulação da resposta inflamatória.

*PISCF: Prolina-Isoleusina-Serina-Cisteína-Fenilanina, sequência de aminoácidos que caracteriza um tipo de alatostatina. Adaptado de Adamski et al. (2019).

Explorar essas similaridades proporciona um amplo conhecimento para entender os mecanismos que causam doenças complexas como síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. Essas semelhanças permitem que pesquisadores utilizem os modelos invertebrados em estudos comparativos para investigar os processos biológicos que desencadeiam essas doenças, bem como identificar potenciais alvos de tratamentos (PEIXOTO; NALIATO; THEODORO, 2024).

6.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico constitui a primeira linha de defesa contra patógenos, sendo essencial na manutenção da homeostase e prevenção de doenças. Embora os insetos não possuam imunidade adaptativa – responsável pela produção de anticorpos e células de memória – sua imunidade inata é altamente conservada ao longo da evolução e apresenta similaridade com a dos vertebrados (LAVINE; STRAND, 2002; MARENA et al., 2025). Dois importantes mecanismos são desencadeados durante a resposta imune inata: resposta celular e a resposta humoral. A resposta celular é mediada por hemócitos, enquanto a humoral envolve processos como melanização (via fenoloxidase), coagulação da hemolinfa, produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), ROS e opsoninas (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013).

A primeira barreira de defesa física é a cutícula da larva, composta pela endocutícula (camada interna, rica em fibrilas de quitina) e pela epicutícula (camada externa, composta por ácidos graxos, lipídios e esteróis). Essas estruturas criam uma barreira densa e resistente à entrada de patógenos, embora possa ser danificada (GIAMMARINO et al., 2024). Em seguida, o trato digestivo contribui com fatores adicionais de defesa, como enzimas digestivas, pH e microbiota intestinal (CANTERI DE SOUZA et al., 2018).

Os hemócitos são responsáveis pela resposta celular, atuando na defesa do organismo por meio de fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos e autofagia (JO et al., 2021). Essas células exibem semelhanças estruturais e funcionais com os neutrófilos nos vertebrados. Circulam pela hemolinfa ou se encontram aderidas aos órgãos internos reconhecendo patógenos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (MARENA et al., 2025). Os PRRs detectam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como os lipopolissacarídeos (LPS), os peptídeoglicanos (PGN) e os β -glucanos. Eles são ainda detectados pelas vias Toll (TLRs), imunodeficiência (Imd) ou JAK/STAT (JANG et al., 2022). Seis tipos de hemócitos já foram descritos: pró-hemócitos, plasmáticos, oenocitoides, esferulócitos, granulócitos e coagulócitos. Os pró-hemócitos são considerados células-tronco, capazes de se diferenciar nas demais linhagens celulares. Plasmáticos e granulócitos, mais abundantes na fase larval, são responsáveis pela produção de fatores antimicrobianos, fagocitose e encapsulamento (LAVINE; STRAND, 2002). Os esferulócitos atuam no transporte e secreção de peptídeos, enquanto os coagulócitos são essenciais para a coagulação da hemolinfa. Já os oenocitoides ativam a cascata de fenoloxidase que desempenham papel na melanização da hemolinfa (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013).

A melanização é iniciada após a infecção, pela ativação da cascata da pró-fenoloxidase por serinas proteases liberadas pelos oenocitoides. A serina converte a pró-fenoloxidase em fenoloxidase, que polimeriza quinonas e gera melanina ao redor do patógeno e/ou do tecido lesado. Esse processo forma manchas escuras na cutícula e pode se disseminar gradualmente por todo o corpo da larva (MARENA et al., 2025). A melanina produzida é uma substância tóxica e, por isso, sua produção é altamente regulada,

os níveis excessivos podem levar à morte da larva (por toxicidade ou pela gravidade da infecção) (GIAMMARINO et al., 2024).

Na resposta humoral, diversas vias sinalizadoras são ativadas, envolvendo opsoninas, AMPs, lisozimas e os processos de coagulação e melanização. A produção de AMPs é desencadeada pela via de sinalização Toll, Imd e JAK/STAT, que ativam os fatores de transcrição Dif, homólogos ao NF-κB de mamíferos, resultando em uma resposta antimicrobiana (SHEEHAN et al., 2018). Toll é ativado após a entrada de bactérias Gram- positivas e a via Imd reconhece PGNs de bactérias Gram-negativas e é funcionalmente análoga à via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF) em humanos. Juntamente com a via JAK/STAT elas ainda regulam citocinas, ROS, óxidos de nitrogênio e aminas biogênicas (JANG et al., 2022).

Em *T. molitor*, são descritas quatro classes de AMPs, denominadas Tenecinas 1, 2, 3 e 4. Cada uma apresenta uma ação específica: Tenecina 2 atua contra bactérias Gram-negativas e fungos; Tenecina 3, rica em glicina, é efetiva contra fungos, enquanto Tenecina 1 e 4 atuam apenas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente (CANTERI DE SOUZA et al., 2018). Embora os insetos não possuam imunidade adaptativa, apresentam uma preparação imunológica, denominada *priming* imunológico. Esse processo consiste em uma resposta imune mais rápida e eficiente à exposição subsequente do mesmo agente invasor (PEIXOTO; NALIATO; THEODORO, 2024).

As respostas se influenciam mutuamente, os fatores humorais afetam a função dos hemócitos, que por sua vez, são uma fonte importante de diversas moléculas humorais (JANG et al., 2022). Compreender a dinâmica e as semelhanças entre os sistemas imunes de invertebrados e vertebrados é fundamental para o avanço científico, proporcionando novas perspectivas de pesquisas e inspirando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras (CANTERI DE SOUZA et al., 2018).

7 ANTIFÚNGICOS

As infecções fúngicas invasivas (IFIs) continuam sendo um desafio global de saúde pública, afetando anualmente mais de 6,55 milhões de pessoas e resultando em 3,75 milhões de mortes (DENNING, 2024). As espécies mais comuns que causam IFIs são *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* e *Pneumocystis*, muitas delas estão relacionadas a vulnerabilidade imunológica dos indivíduos afetados (BORJIAN BOROUJENI et al., 2021).

Um tratamento efetivo contra essas infecções depende da otimização entre a eficácia e a segurança da ação dos antifúngicos. No entanto, o uso excessivo e/ou constante desses medicamentos pode levar à toxicidade de diferentes órgãos, bem como ao aumento da resistência dos fungos a esses medicamentos (CUI et al., 2022). O risco é multifatorial, envolvendo a presença de doenças preexistentes, dados demográficos, interações medicamentosas, fatores ambientais, genéticos, gravidez e tratamento de doenças

subjacentes. Todos esses fatores contribuem para a progressão da toxicidade (TVERDEK; KOFTERIDIS; KONTOYIANNIS, 2016).

Atualmente, os antifúngicos são distribuídos em cinco classes distintas: os polienos, azóis, equinocandinas, alilaminas e pirimidinas. Cada uma delas possui um espectro de ação específico, agindo em diferentes partes das células fúngicas. Apresentam ainda, diferenças em termos de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, perfil de segurança, dosagem e preço (PECHO; ZEITLINGER, 2024).

Um exemplo clássico de polieno é a anfotericina B, que atua como fungicida ou fungistática dependendo da concentração nos fluidos corporais e da susceptibilidade do fungo. Seu mecanismo de ação envolve a ligação ao ergosterol presente na membrana celular dos fungos, resultando na formação de canais transmembrana que alteram a permeabilidade celular levando à morte da célula fúngica (DRUGBANK, 2024a). A anfotericina B é indicada para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., *Cryptococcus*, *Aspergillus fumigatus* entre outras (MARTINEZ, 2006). No entanto, seu uso excessivo pode provocar efeitos colaterais como a nefotoxicidade, limitando seu uso em pacientes renais. Novas formulações lipídicas da anfotericina B têm demonstrado menor toxicidade, mantendo sua eficácia, são elas: complexo lipídico anfotericina B (ABLC), anfotericina B lipossomal (LAmb) e dispersão coloidal anfotericina B (ABCD) (TVERDEK; KOFTERIDIS; KONTOYIANNIS, 2016).

Os azóis, incluindo imidazóis e triazóis, são antifúngicos que interferem na biossíntese do ergosterol e a desmetilação do lanosterol (componentes importantes da membrana celular), alterando a permeabilidade da membrana e a integridade das células fúngicas (DRUGBANK, 2024b). O fluconazol, por exemplo, é amplamente utilizado no tratamento de infecções leveduriformes por espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus*. Já o itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol possuem atividade contra leveduras, mas também contra fungos filamentosos (DEBERALDINI; DOS SANTOS, 2021). Os azóis podem interagir facilmente com outras medicações e causar efeitos adversos, como intolerância gastrintestinal, hepatotoxicidade e hipersensibilidade. São medicamentos teratogênicos e não devem ser administrados em gestantes (CUI et al., 2022).

Por outro lado, as equinocandinas, agem sobre um importante componente da parede celular do fungo, o 1, 3-glucano. Elas bloqueiam a enzima β-1,3-glucano sintase, interrompendo a biossíntese deste componente e comprometendo a integridade celular (DRUGBANK, 2024c). As equinocandinas, como a caspofungina, micafungina e anidulafungina, são eficazes contra espécies de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., sendo fungicidas e fungistáticas, respectivamente. Seus efeitos adversos e interações medicamentosas são mínimas e sua administração é exclusivamente endovenosa (HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

A pirimidina em destaque é a 5-fluorocitosina (5-FC), que se incorpora no DNA e no RNA, inibindo a síntese de proteínas e causando defeitos na divisão celular fúngica. Demonstrou maior eficácia em

associação com a anfotericina B tratando meningite criptocócica. Seus efeitos adversos incluem nefrotoxicidade e supressão da medula óssea. A terbinafina, uma alilamina, provoca deficiência no ergosterol comprometendo a membrana celular dos fungos levando à morte celular (PLANALTO; ALSPAUGH; MAZU et al., 2016). São antifúngicos de amplo espectro e baixa toxicidade, exercendo ação fungicida contra dermatófitos e fungistática contra *Candida albicans*. Disponíveis em forma oral, tópica e intravenosa (CAMPOY; ADRIO, 2017).

O arsenal terapêutico antifúngico é restrito, com fármacos disponíveis apresentando importantes limitações como toxicidade, penetração tecidual e interações medicamentosas. Assim, a pesquisa por novas terapias é essencial (HUANG et al., 2023). Potenciais antifúngicos de origem natural, como o extrato de própolis, vem sendo estudado em suas diversas aplicações, propriedades, baixa citotoxicidade e ausência de relatos de interações medicamentosas, com ações antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias, antitumorais, entre outras (CORRÊA et al., 2020). A nanomedicina também tem se mostrado promissora na terapêutica, especialmente as nanopartículas com propriedades físico-químicas diversas que podem ser utilizadas de forma minimamente invasiva e específica potencializando a eficácia do fármaco (KISCHKEL et al., 2020).

Diante desse cenário desafiador, a pesquisa contínua de novos potenciais antifúngicos e a compreensão dos mecanismos de resistência dos fungos são importantes para o desenvolvimento de estratégias eficazes no combate às infecções fúngicas (CORRÊA et al., 2020). As combinações terapêuticas, produtos naturais e nanopartículas podem ser novas possibilidades para enfrentar esse problema (KISCHKEL et al., 2020).

REFERÊNCIAS

ABIHPEC (2023). Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, 26 de fevereiro de 2024, São Paulo. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-24/>>. Acesso em 29 ago. 2024.

ABREU, C. L. D. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária. Brasília/DF: [s.n.].

ADAMSKI, Z.; BUFO, S. A.; CHOWAŃSKI, S.; FALABELLA, P.; LUBAWY, J.; MARCINIAK, P. Beetles as Model Organisms in Environmental Studies—Physiological, Biomedical and Physiological Review. *Frontiers in Physiology*, v. 10, 2019.

ALLEGRA, E. et al. Galleria mellonella larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. *Chemosphere*, v. 198, p. 469–472, 2018.

ALVES, M.S.; STREIT, L.; PIZZOLATO, T. M. Utilização de modelos in silico para avaliação da toxicidade de resíduos de agrotóxicos, fármacos e metabólitos em águas naturais. *Química nova*, v. 46, n. 9, p. 881–889, 2023.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2015). Resolução – RDC Nº 35, de 7 de agosto de 2015. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diário Oficial da União de 10 de agosto de 2015, Seção 1, p.44. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32389206/do1-2015-08-10-resolucao-rdc-n-35-de-7-de-agosto-de-2015-32389026>. Acesso em: 29 ago. 2024.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 211, de 14 de julho de 2005. Dispõe sobre a regulamentação de produtos para a saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p.1-2, 15 jul. 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2024). Conceitos e definições. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/medicamentos/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: 2 set. 2024.

BANERJEE, P. et al. ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic acids research*, v. 52, n. W1, p. W513–W520, 2024.

BORJIAN BOROUJENI, Z. et al. Distribution of invasive fungal infections: Molecular epidemiology, etiology, clinical conditions, diagnosis and risk factors: A 3-year experience with 490 patients under intensive care. *Microbial Pathogenesis*, v. 152, 1 mar. 2021.

BRACVAM - Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos. 2024. Disponível em: <https://www.bracvam.fiocruz.br/>. Acesso em: 2 set. 2024.

BRAI, A. et al. *Tenebrio molitor* as a simple and cheap preclinical pharmacokinetic and toxicity model. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 3, p. 2296, 2023.

BRASIL. (2008). Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União de 9 de outubro de 2008, Seção 1, Pág. 8. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 29 ago. 2024.

BRASIL. (2009). Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União de 16 de julho de 2009, Seção 1, Pág. 2. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm>. Acesso em: 29 ago. 2024.

BRASIL. Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos - Versão 2. Brasília, DF: Anvisa, 2013.

Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-demedicamentos-versao-2.pdf/view>>. Acesso em: 2 set. 2024.

BRASIL. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, DF: Anvisa, 2012.

Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>>. Acesso em: 2 set. 2024.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, v. 4, n. 7, p. 597–603, 2013.

CAMPOY, S.; ADARIO, J. L. Antifungals. *Biochemical pharmacology*, v. 133, p. 86–96, 2017.

CANTERI DE SOUZA, P. et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 4, n. 4, p. 125, 2018.

CANTERI DE SOUZA, P.; DE ALMEIDA, R. S. C. Modelos invertebrados no estudo de infecções fúngicas e na avaliação de antifúngicos. Londrina, PR: Universidade Estadual de Londrina, 2016.

CHANG, Y. et al. A guide to in silico drug design. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 49, 2022.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.

Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/paginas/publicacoes-legislacao-e-guia/guia-brasileiro-de-producao-manutencao-ou-utilizacao-de-animais-para-atividades-de-ensino-ou-pesquisa-cientifica>>. Acesso em: 29 ago. 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. NOTA INFORMATIVA CONCEA/No 01/2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/nota-informativa-concea-no-01-2024>>. Acesso em: 29 ago. 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Diário Oficial da União de 25 de setembro de 2014, Seção 1, Pág. 9, 2014b. Disponível em:https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf Acesso em: 29 ago. 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2022c). Resolução Normativa Nº 56, de 5 de outubro de 2022. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União de 7 de outubro de 2022, Seção 1, Pág. 15. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-56-de-5-de-outubro-de-2022-434544861>. Acesso em: 29 ago. 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2023). Legislação do Concea. Consulta institucional. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/paginas/publicacoes-legislacao-e-guia/legislacao-do-concea> Acesso em: 29 ago. 2024.

CORRÊA, J. L. et al. Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. Journal of ethnopharmacology, v. 256, n. 112791, p. 112791, 2020.

CUI, X. et al. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. Journal of infection and public health, v. 15, n. 9, p. 986–1000, 2022.

DEBERALDINI, M.; DOS SANTOS, J. Infecções Fúngicas Invasivas: Aspectos Gerais e Tratamento Invasive Fungal Infections: An Overview and Treatment. ULAKES Journal of Medicine. Deberaldini and Santos. ULAKES J Med. v. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://revistas.unilago.edu.br/index.php/ulakes>>.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. The Lancet infectious diseases, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

DEORE, A. B. et al. The stages of drug discovery and development process. Asian journal of pharmaceutical research and development, v. 7, n. 6, p. 62–67, 2019.

DISNER, G. R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. Evidência - Ciência e Biotecnologia, v. 19, n. 2, p. 259–274, 2019.

DOS SANTOS, K. S. et al. Alginate-based 3D A549 cell culture model to study *Paracoccidioides* infection. Journal of fungi (Basel, Switzerland), v. 9, n. 6, p. 634, 2023.

DRUGBANK. Amphotericin B. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00681>. Acesso em: 14 set. 2024a.

DRUGBANK. Caspofungin. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00520>. Acesso em: 14 set. 2024c.

DRUGBANK. Itraconazole. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01167>. Acesso em: 14 set. 2024b.

EBERLIN, S. et al. Métodos Alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil. RN, v. 18, p. 214, 2019.

ELEFTHERIOU, E. et al. Chromosome-scale assembly of the yellow mealworm genome. Open research Europe, v. 1, p. 94, 2022.

FUSCO-ALMEIDA, A. M. et al. Alternative non-mammalian animal and cellular methods for the study of host-fungal interactions. Journal of fungi (Basel, Switzerland), v. 9, n. 9, p. 943, 2023.

GHS. Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos. Disponível em: <<https://ghs-sga.com/?lang=pt-br>>. Acesso em: 14 set. 2024.

GIAMMARINO, A.; BELLUCCI, N.; ANGIOLELLA, L. *Galleria mellonella* as a model for the study of fungal pathogens: Advantages and disadvantages. Pathogens, v. 13, n. 3, p. 233, 2024.

GÖETHEL, G. et al. The role of alternative toxicological trials in drug discovery programs. The case of *Caenorhabditis elegans* and other methods. Current medicinal chemistry, v. 29, n. 32, p. 5270–5288, 2022.

HOUŠT, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. Metabolites, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.

HUANG, T. et al. Using inorganic nanoparticles to fight fungal infections in the antimicrobial resistant era. Acta Biomaterialia Inc., , 1 mar. 2023.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. Journal of applied toxicology: JAT, v. 37, n. 1, p. 50–59, 2017.

JANG, H. A. et al. Current status of immune deficiency pathway in *Tenebrio molitor* innate immunity. Frontiers in immunology, v. 13, p. 906192, 2022.

JARROS, I. C. et al. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. EXCLI journal, v. 19, p. 687–704, 2020.

JO, Y. H. et al. Autophagy in *Tenebrio molitor* immunity: Conserved antimicrobial functions in insect defenses. Frontiers in immunology, v. 12, p. 667664, 2021.

KATOCH, S.; PATIAL, V. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. Journal of applied toxicology: JAT, v. 41, n. 1, p. 33–51, 2021.

KAUR, S.; STINSON, S. A.; DICENZO, G. C. Whole genome assemblies of *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor*. G3 (Bethesda, Md.), v. 13, n. 6, 2023.

KESHAVARZ, M. et al. *Tenebrio molitor* PGRP-LE plays a critical role in gut antimicrobial peptide production in response to *Escherichia coli*. Frontiers in physiology, v. 11, p. 320, 2020.

KISCHKEL, B. et al. Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. Future microbiology, v. 15, n. 7, p. 521–539, 2020.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect biochemistry and molecular biology, v. 32, n. 10, p. 1295–1309, 2002.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *The British journal of nutrition*, v. 120, n. s1, p. S1–S7, 2018.

MADDEN, J. C. et al. A review of in silico tools as alternatives to animal testing: Principles, resources and applications. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, v. 48, n. 4, p. 146– 172, 2020.

MARCOMINI, E.; NEGRI, M. Fungal quorum-sensing molecules and antiseptics: A promising strategy for biofilm modulation? *Drug discovery today*, v. 28, n. 7, p. 103624, 2023.

MARENA, G. D. et al. *Galleria mellonella* as an invertebrate model for studying fungal infections. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 2, 2025.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MAZU, T. K. et al. The mechanistic targets of antifungal agents: An overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 16, n. 7, p. 555–578, 2016.

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). 2024. Disponível em:
<https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html> . Acesso em: 14 set. 2024.

MORETTO, L. D. & STEPHANO, M. A. (2019) Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil. São Paulo: Limay. 732 p.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. Test guidelines programme for the testing of chemicals. 2021. Disponível em:

<https://www.oecdilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788?_ga=2.164379579.545124248.1629039219-

OECD, 2010. Test No. 129: Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systematic toxicity tests, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <http://www.ceuaics.ufba.br/sites/ceuaics.ufba.br/files/OECD%20TG%20129.pdf>. Acesso em: 07/11/2021.

OECD, 2002a. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2016a. Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2016b. Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2002b. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2008. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2004a. Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2004b. Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2010. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2015. Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2019. Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2019. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2015. Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2020. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring

Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2018. Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2021. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2010. Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD (2024), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2021. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2017. Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2016c, Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2020. Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD, 2019. Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD (2021), Test No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD (2019), Test No. 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD (2024), Test No. 496: In vitro Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for

Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OPPERT, B. et al. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e34624, 2012.

PECHO, T.; ZEITLINGER, M. Preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic studies and clinical trials in the drug development process of EMA-approved antifungal agents: A review. *Clinical pharmacokinetics*, v. 63, n. 1, p. 13–26, 2024.

PEDRO, D. A.; BENTO, T. F. M. Legislação sobre alternativas à experimentação animal e métodos reconhecidos entre 2014 e 2022 no Brasil. *Pubvet*, v. 17, n. 04, p. e1375, 19 abr. 2023.

PEDRO, D. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA: EVOLUÇÃO E PANORAMA ATUAL DO BRASIL. *Enciclopédia Biosfera*, v. 18, n. 37, 30 set. 2021.

PEIXOTO, J. V.; NALIATO, G. F. S.; THEODORO, R. C. *Tenebrio molitor* como organismo modelo para estudo de virulência de patógenos animais fúngicos. Natal, RN: Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, 2024.

PEREIRA, M. F.; ROSSI, C. C. Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, v. 128, n. 12, p. 607–620, 2020.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New Horizons in antifungal therapy. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 2, n. 4, 2016.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs), *Animais de Laboratório: criação e experimentação* (p. 388). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ

RIBEIRO, I. M. M.; DE MORAES ALVES, M. M.; DE MENDONÇA, I. L. LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anarcadium occidentale* L.) (LCC) E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES: ATIVIDADES ANTI-Leishmania, TOXICOLÓGICA E IMUNOMODULADORA. Piauí: Universidade Federal do Piauí, 2021.

RUSSEL, W. M. S. & BURCH, R. L. (1992). The Principles of Humane Experimental Technique. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) - Special Edition. London, 1992. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>

SERRANO, I. et al. The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), v. 12, n. 3, 2023.

SHEEHAN, G. et al. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 1625–1639, 2018.

SINGH, G. Preclinical drug development. Em: *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 47–63.

SINGKUM, P. et al. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, v. 66, n. 1, p. 31–55, 2019.

TADICH, T.; TARAZONA, A. M. Replacement, reduction and refinement: Ethical considerations in the current applications of the 3Rs. Em: *Collaborative Bioethics*. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 667–683.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, v. 54, n. 2, p. 120–132, 2015.

TVERDEK, F. P.; KOFTERIDIS, D.; KONTOYIANNIS, D. P. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 14, n. 8, p. 765–776, 2016.

VOMMARO, M. L. et al. Anatomical changes of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum* during complete metamorphosis. *Cell and tissue research*, v. 396, n. 1, p. 19–40, 2024.

ZBINDEN, G.; FLURY-ROVERSI, M. Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Archives of toxicology*, v. 47, n. 2, p. 77–99, 1981.

ZINGALES, V. et al. The growing importance of three-dimensional models and microphysiological systems in the assessment of mycotoxin toxicity. *Toxins*, v. 15, n. 7, p. 422, 2023.

ANEXOS

Anexo 1. Principais diretrizes da OECD com modelos alternativos para estudos não clínicos recomendados pela ANVISA e pelo CONCEA.

Testes	Definição	Modelo convencional	Modelo alternativo	Guia OECD dos alternativos
Toxicidade aguda (dose única)	Avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas.	Mínimo duas espécies de mamíferos. Duas vias de administração: 1) a pretendida para administração em humanos; 2) a parenteral.	Procedimento de dose fixa.	(OECD, 420)
			Método de classe de toxicidade aguda.	(OECD, 423)
			Protocolo “up-and-down”.	(OECD, 425)
Toxicidade subaguda e subcrônica (doses repetidas)	Caracteriza o perfil toxicológico da Substância pela administração repetida.	Mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. Deverá ser utilizada a via em que o fármaco será administrado em humanos, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também uma via parenteral.	Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda. <i>In vitro</i> toxicidade com linhagem celular 3T3 NRU.	(OECD, 129)
Toxicidade do desenvolvimento e reprodução	Revela efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos.	Para fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial e desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna, mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos. Para desenvolvimento embriofetal, duas espécies: uma roedora e uma não roedora, preferencialmente coelhos. A dosagem e via variam conforme o teste.	Teste de triagem de reprodução/desenvolvimento de toxicidade.	(OECD, 421)
Toxicidade do desenvolvimento e reprodução	Revela efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos.	Para fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial e desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna, mínimo uma espécie roedora, preferencialmente ratos. Para desenvolvimento embriofetal, duas espécies: uma roedora e uma não roedora, preferencialmente coelhos. A dosagem e via variam conforme o teste.	Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/toxicidade no desenvolvimento.	(OECD, 422)

Genotoxicidade	<p>Detecta o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas.</p>	<p>Testes <i>in vitro</i>: mutação gênica em bactéria; teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (teste de aberrações cromossômicas ou teste de micronúcleo) ou teste de mutação gênica em células tk de linfoma de camundongo.</p> <p>Testes <i>in vivo</i>: dano cromossômico em células hematopoieticas de roedores.</p>		
Carcinogenicidade	<p>Identificar substâncias que possam causar um desenvolvimento de câncer em algum sítio por algum mecanismo, observando testes animais para o desenvolvimento de lesões como Consequência da exposição, durante um tempo considerável de sua vida, por várias doses da substância teste e por uma via de administração apropriada.</p>	<p>Estudo em roedor de longo prazo, conduzidos com administração pela mesmavia de administração pretendida na clínica.</p>	<p>Teste de micronúcleos em células de mamíferos <i>in vitro</i>. Linfócitos primários de sangue periférico humano ou de outros mamíferos como roedores.</p>	(OECD, 487)
Tolerância local	<p>Avalia quaisquer efeitos mecânicos da administração ou ações meramente físico-químicas do produto que podem ser distinguidas de efeitos toxicológicos ou farmacodinâmicos.</p>	<p>A espécie animal e a via de administração dependerão do problema a ser investigado e ao modelo considerado adequado.</p>	<p>Não há teste validados, deve seguir as orientações gerais para testes químicos ou as diretrizes disponíveis para absorção dérmica.</p>	NR
Corrosividade e irritação dérmica	<p>Danos reversíveis ocasionados à pele (eritemas, ressecamento e edema) após a aplicação da substância teste e posterior avaliação segundo a escala de Draize.</p>	<p>A espécie animal são coelhos albinos Nova Zelândia. Aplicação da amostra teste pura ou diluída (de acordo com o uso), no dorso tricotomizado das cobaias.</p>	<p>Corrosão cutânea <i>in vitro</i>: teste de resistência elétrica transcutânea.</p>	(OECD, 430)
			<p>Corrosão cutânea <i>in vitro</i>: teste da epiderme humana reconstituída.</p>	(OECD, 431)
			<p>Teste de membrana de barreira <i>in vitro</i> para corrosão da pele.</p>	(OECD, 435)
			<p>Irritação cutânea <i>in vitro</i>: método de reconstrução da epiderme humana.</p>	(OECD, 439)
Sensibilização cutânea	<p>Avaliar o potencial alergênico de ingredientes e produtos por meio de injeção intradérmica e/ou aplicação</p>	<p>Porquinho-da-índia são os mais utilizados.</p>	<p><i>In vivo</i> para sensibilização cutânea com linfócitos de camundongo, mas com número reduzido de animais radiomarcados.</p>	(OECD, 429)
			<p>Versões não radioativas do ensaio do linfonodo local.</p>	(OECD, 442 A e B)

	epidérmica em animais de experimentação.		Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade peptídica (DPRA). Ensaios de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> que abordam o evento-chave <i>Adverse Outcome Pathway</i> (AOP), sobre a ativação do queratinócito.	(OECD, 442 C) (OECD, 442 D)
Absorção/ penetração cutânea	Estudos de absorção percutânea para avaliações de segurança após exposição dérmica.	O rato é a espécie mais usada. A substância de teste é aplicada na pele cortada de animais em um ou mais níveis de dosagem apropriados na forma de uma preparação representativa em uso.	<i>Ex vivo</i> , fragmentos de pele humana ou animal.	(OECD, 428)
Irritação e corrosão ocular e das mucosas	Instalação da amostra teste pura ou diluída, de acordo com o uso, no saco conjuntival de cobaias.	A espécie animal são Coelhos albinos Nova Zelândia.	Método de teste ocular isolado da galinha, para identificar: 1) substâncias químicas que provocam lesões oculares graves; 2) substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves.	(OECD, 438)
			Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos.	(OECD, 460)
			Método de teste <i>in vitro</i> de exposição a curto prazo para identificação de: 1) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho; 2) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho.	(OECD, 491)
			Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave.	(OECD, 492)
			Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular.	(OECD, 494)
			Teste macromolecular <i>in vitro</i> para identificação de substâncias químicas que	

			induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo. <i>In vitro</i> , utiliza linhagem celular 3T3 NRU.	(OECD, 496) (OECD, 432)
Fototoxicidade e fotorreatividade	Definida como uma resposta tóxica provocada por produtos químicos fotorreativos/fototóxicos administrados topicalmente ou sistemicamente após a exposição do corpo à luz ambiental.	NR	Ensaio de fotorreatividade por ROS.	(OECD, 495)
Toxicocinética e toxicodinâmica	A toxicocinética é a descrição da exposição sistêmica obtida em animais e a sua relação com o nível de dose e o tempo. A toxicodinâmica pesquisa os potenciais efeitos farmacodinâmicos indesejáveis da substância teste nas funções fisiológicas dos diversos sistemas orgânicos em relação ao nível de exposição.	A escolha da espécie animal deve ser de acordo com a sua relevância para a obtenção de dados e a extração das conclusões para seres humanos. A mesma via ser administrada em humanos, quando possível.	Não há testes validados.	NR

NR: Não relatado. Adaptado de Moretto e Stephano (2019); BRASIL (2012); BRASIL (2013); OECD (2021); CONCEA (2023).