



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EMILAY NATÁLIA SILVA DO NASCIMENTO

**Efeito protetor do ácido fólico como suplemento
alimentar contra a intoxicação fetal por
deltametrina em modelo de *zebrafish***

RECIFE

2024

EMILAY NATÁLIA SILVA DO NASCIMENTO

Efeito protetor do ácido fólico como suplemento alimentar contra a intoxicação fetal por deltametrina em modelo de *zebrafish*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador:

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244e Nascimento, Emilly Natália Silva do
Efeito protetor do ácido fólico como suplemento alimentar contra a intoxicação febril por deffameirina em
modelo de zebrafish / Emilly Naiália Silva do Nascimento. - 2024.
41 f. : il.
- Orientador: Prof. Dr. Pabyon Goncalves Cadena.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2024.
1. Danio rerio. 2. Ecotoxicologia. 3. Toxicidade. 4. Embrião. I. Cadena, Prof. Dr. Pabyon Goncalves,
orient. II. Título

EMILAY NATÁLIA SILVA DO NASCIMENTO

Efeito protetor do ácido fólico como suplemento alimentar contra a intoxicação fetal
por deltametrina em modelo de *zebrafish*

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Área de concentração: Bacharelado em Ciências Biológicas

Data de defesa: 07/03/2024

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dra. Renata Meireles Oliveira Padilha
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MSc. Renatta Priscila Ferreira Silva
Universidade Federal de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todo o auxílio que Ele me concedeu durante este processo, me fortalecendo em cada momento de dificuldade.

Aos meus pais Jandys e Ernandes por terem contribuído para que eu pudesse chegar até aqui. Especialmente, à minha mãe cujo apoio e sacrifícios tornaram possível a minha educação. Também agradeço a Magno por todo o apoio, paciência e ajuda durante a graduação, principalmente por ter me concedido o privilégio de não precisar do transporte público.

Aos meus amigos, que estiveram sempre presentes para oferecer palavras de encorajamento, suporte emocional e dividirem as lágrimas nos momentos de desespero (não foram poucos). Agradeço a Mariane que sempre esteve disponível e me abrigou em sua residência, também agradeço a Eduarda que embora demore 3 dias para me responder, sempre me ajudou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, agradeço por sua paciência e ajuda que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação. Suas sugestões, críticas construtivas e apoio constante foram fundamentais para que eu pudesse alcançar os resultados que apresento hoje.

A todos da equipe LECA que de alguma forma contribuíram para este projeto, através de sugestões e colaborações. Especialmente, faltam palavras para agradecer a Jadson por sua disposição, apoio e ENORME paciência com meus surtos e milhares de mensagens (vários áudios de 5 minutos).

Por fim, agradeço a todos que acreditaram em mim e me incentivaram durante esta jornada. Este trabalho não seria possível sem o apoio e contribuições de cada um de vocês. Obrigada por fazerem parte desta conquista.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco, aos membros da banca examinadora e a FACEPE pelo apoio financeiro.

RESUMO

A deltametrina (Del), inseticida piretróide amplamente utilizado no controle biológico de pragas apresenta riscos para o desenvolvimento fetal humano. Nesse contexto, a proteção do ácido fólico (AF) contra a Del foi estudada, abrindo perspectivas promissoras para estratégias de proteção contra pesticidas utilizando o AF como suplemento alimentar para gestantes. Diante disto, esta pesquisa teve como objetivo propor o AF como agente protetor contra intoxicação fetal por Del em modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*). Foram realizados dois testes, o experimento de toxicidade aguda com exposição por 6 h, utilizamos 5 grupos experimentais com 35 indivíduos por grupo ($n = 175$) para a avaliação da epibolia com 8 hpf. Os estágios de desenvolvimento foram avaliados em teste de toxicidade aguda com exposição por 22h, neste teste, utilizamos 4 grupos experimentais com 6 repetições e 15 indivíduos por grupo ($n = 360$). Durante 96 hpf, foram analisados os seguintes parâmetros de desenvolvimento, taxa de sobrevivência, efeitos teratogênicos, frequência cardíaca e taxa de eclosão. Foi possível observar nos testes realizados uma redução significativa na epibolia dos embriões expostos à concentração Del 500 $\mu\text{g/L}$. Enquanto ao tratar com o AF 75 μM se manteve dentro da normalidade, demonstrando um efeito protetor contra a intoxicação fetal por Del. Ainda, o mesmo ocorreu no teste de frequência cardíaca com 96 hpf, como descrito acima com ambas as concentrações. Entretanto, não foi observado efeito protetor de AF nos efeitos teratogênicos causados por Del. De acordo com os resultados obtidos, analisando o efeito protetor do AF contra a intoxicação fetal por Del, concluímos que foi possível avaliar que a utilização do AF obteve um efeito protetor parcial, pois protegeu apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e na frequência cardíaca. Até o momento, não foi identificado nenhum suplemento alimentar que ofereça proteção completa contra a exposição aos pesticidas. Dessa forma, é crucial que as gestantes tomem precauções para evitar o contato com esses produtos químicos.

Palavras-Chave: *Danio rerio*, Ecotoxicologia, Toxicidade, Embrião.

ABSTRACT

Deltamethrin (Del), a widely used pyrethroid insecticide in biological pest control, offers risks to human fetal development. In this framework, the protective effect of folic acid (FA) against Del was studied, opening promising perspectives for pesticide protection strategies using FA as a dietary supplement for pregnant women. Therefore, this research aimed to propose FA as a protective agent against fetal intoxication by Del in a zebrafish (*Danio rerio*) animal model. For the acute toxicity test with a 6-hour exposure, we used 5 experimental groups with 35 fish per group ($n = 175$) for epiboly evaluation at 8 hpf. Developmental stages were assessed in the acute toxicity test with a 22-hour exposure, where we used 4 experimental with 6 replicates and 15 fish per group ($n = 360$). During 96 hpf, development parameters such as survival rate, teratogenic effects, heart rate, and hatching rate were analyzed. Significant reduction in epiboly of embryos exposed to Del at 500 $\mu\text{g/L}$ was observed in the tests, while treating with FA 75 μM remained within normality, demonstrating a protective effect against fetal intoxication by Del. The same occurred in the heart rate test at 96 hpf, as described above with both concentrations. However, no protective effect of FA on teratogenic effects caused by Del was observed. According to the results, analyzing the protective effect of FA against fetal intoxication by Del, we conclude that FA use had a partial protective effect, as it only protected in the early stages of embryonic development and the heart rate. So far, no dietary supplement offering complete protection against pesticide exposure has been identified. Therefore, pregnant women must take precautions to avoid contact with these chemicals.

Keywords: *Danio rerio*, Ecotoxicology, Toxicity, Embryos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 - Teste de toxicidade aguda com exposição por 6 h, para avaliação da epibolia.....	23
Fluxograma 2 - Teste de toxicidade aguda com exposição por 22 h, para avaliação do desenvolvimento embrio-larval	24
Figura 1 - Percentual da epibolia de embriões de <i>zebrafish</i> , avaliados em 8 hpf, dos grupos experimentais com as concentrações de Del 500 µg/L, AF 75 µM, AF 50 µM + Del, AF 75 µM + Del por 6 h. Os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(4, 209) = 19,4, p < 0,001$). A epibolia foi considerada significativa (*) quando $p < 0,05$	25
Figura 2 - Taxa de sobrevivência até 144 hpf das larvas de <i>zebrafish</i> com as concentrações de Del 500 µg/L, AF 75 µM, AF 75 µM + Del. Cada grupo experimental foi comparado ao controle por two-way ANOVA ($F(3, 119) = 0,03, p < 0,99$) e tempo ANOVA ($F(4, 119) = 7,05, p < 0,001$), foi considerada significativa (*) quando $p < 0,05$	26
Figura 3 - (A) percentual animais afetados durante 24 hpf. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 3,77, p < 0,03$); (B) percentual de animais afetados durante 72 hpf. Os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 16,41, p < 0,001$). Os animais afetados foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$; (C) frequência cardíaca durante 48 hpf. Comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 356) = 3,81, p < 0,01$); (D) frequência cardíaca durante 96 hpf. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 352) = 3,58, p < 0,01$). Os grupos experimentais foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$	27
Figura 4 - Percentual da taxa de eclosão do <i>zebrafish</i> em 72 hpf com as concentrações de Del 500 µg/L, AF 75 µM, AF 75 µM + Del. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 1,57, p < 0,23$). Os grupos experimentais foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações dos compostos químicos utilizados nos testes de toxicidade aguda com exposição por 6 e 22 h.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de Variância

AF - Ácido fólico

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Del - Deltametrina

DMSO – Dimetilsulfóxido

Hpf - Horas pós-fertilização

Bpm - Batimento por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES	14
2.2 ÁCIDO FÓLICO	14
2.3 PESTICIDAS COMERCIAIS	15
2.4 A DELTAMETRINA COMO INSETICIDA	17
2.5 TOXICIDADE DA DELTAMETRINA EM MODELOS ANIMAIS	17
2.6 RISCOS DOS PIRETRÓIDES PARA GESTANTE	18
2.7 <i>DANIO RERIO</i> COMO MODELO DE INTOXICAÇÃO FETAL	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 GERAL.....	20
3.2 ESPECÍFICO.....	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	21
4.2 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES	21
4.3 REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES	21
4.4 INTOXICAÇÃO FETAL COM DELTAMETRINA	22
4.5 EPIBOLIA	23
4.6 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PROTOCOLO 6861290622	41

1. INTRODUÇÃO

A deltametrina (Del) é um inseticida sintético do grupo dos piretróides, princípio ativo que inicialmente foi extraído da flor do gênero *Chrysanthemum* sp. (STARR et al., 2008), age nos neurônios dos insetos prejudicando o funcionamento dos canais de sódio dependentes de voltagem causando hiperexcitabilidade neural (JOHNSTONE et al., 2017). É amplamente utilizada na agricultura no controle de pragas (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2020). Entretanto, os inseticidas podem ser prejudiciais aos organismos não-alvo como os seres humanos e ainda bioacumular ao longo da cadeia alimentar (LIU et al., 2018).

Os inseticidas podem ser absorvidos por via dérmica, inalatória ou oral (SILVA et al., 2023). Ainda, a Del por apresentar características lipofílicas, também pode ser absorvida pela placenta (LUO et al., 2019). Pesquisas encontraram a presença de Del no sangue de agricultores (AFATA et al., 2021), mecônio de bebês (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2020), leite materno (PALMA et al., 2014) e urina de gestantes (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2020). Dessa forma, a exposição ao inseticida Del pode ser considerado um fator de risco tanto aos humanos adultos, como também para à saúde do feto (SILVA et al., 2023). Ademais, foi observado em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo de intoxicação fetal expostos a Del, a presença de efeitos teratogênicos como alterações morfológicas do coração e deformação da coluna (LI et al., 2019).

O ácido fólico (AF) participa do desenvolvimento fetal contribuindo na prevenção de doenças e anomalias no desenvolvimento do feto (PONTES et al., 2021). Durante a gestação, o fechamento do tubo neural ocorre nas quatro primeiras semanas, entretanto quando esse tubo não consegue completar a neurulação, surge anomalias que, podem resultar em patologias capazes de provocar óbito ou sequelas graves nos recém-nascidos, sendo as mais frequentes a anencefalia e a espinha bífida (ESPOLADOR et al., 2015). Portanto, o ácido fólico é fundamental no processo de desenvolvimento do tubo neural (MARCHIONI et al., 2013), multiplicação celular, aumento no número de eritrócitos, alargamento do útero, crescimento da placenta e do feto (SANTOS; PEREIRA, 2007). De acordo com as diretrizes de suplementação diária de ácido fólico para mulheres grávidas, deve ser incorporado o ácido fólico como suplemento durante o período pré-natal (PONTES et al., 2021), sendo recomendada a ingestão diária de 400 µg (0,4 mg) de ácido fólico (OMS, 2013).

Adicionalmente, estudos utilizando o *zebrafish* avaliaram os efeitos protetores do ácido fólico na intoxicação fetal por etanol (CADENA et al., 2020b), por selenito (MA et al., 2012) e na neuroproteção de *zebrafish* adulto expostos ao fungicida tributilestanho (CAI et al., 2024). Pois, a exposição pré-natal aos inseticidas pode ser associada a malformações congênitas (COSTA et al., 2021), como a falha no fechamento do tubo neural. Dessa forma, esse estudo foi realizado para avaliar o efeito protetor do ácido fólico contra a intoxicação fetal por Del.

Para investigar o possível efeito protetor do ácido fólico contra a intoxicação fetal por Del, foi utilizado o *zebrafish* como modelo animal, devido a sua homologia genética com os humanos, com cerca de 82% de genes ortólogos relacionados a doenças (HOWE et al., 2013). Ademais, a maioria dos seus órgãos desempenham funções análogas a dos mamíferos, o que os tornam fisiologicamente comparável aos humanos, principalmente, no estágio inicial da vida (SILVA et al., 2023; MACRAE CA e PETERSON RT, 2015). Visto que a fase do desenvolvimento do *zebrafish* após 24 horas, pós-fertilização, corresponde ao fim da segmentação e o início do estágio embrionário de farínghula, o que pode ser comparado à gestação humana, aproximadamente ao primeiro trimestre (SYED et al., 2023). Ainda como vantagens experimentais na utilização desse modelo podemos citar a fertilização externa, produção de um grande número de progênies, transparência óptica, tamanho reduzido e rápido desenvolvimento (FUKUSHIMA et al., 2020) atendendo o princípio dos 3Rs (reduzir, refinar e substituir), reduzindo o uso de mamíferos na pesquisa científica (CANEDO et al., 2022) o que contribuiu para redução do tempo da pesquisa e obtenção dos resultados.

Portanto, esse trabalho analisou os possíveis efeitos adversos da exposição fetal à deltametrina e demonstrou a necessidade de estratégias de proteção, como o uso do ácido fólico. Neste trabalho, explicamos a importância de medidas de proteção que possam minimizar os riscos associados a esse agente químico, contribuindo assim para uma maior conscientização e segurança na gestação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os suplementos alimentares consistem em nutrientes disponíveis em várias formas farmacêuticas, sendo integrados como parte de uma abordagem nutricional destinada a indivíduos, quando não conseguem atender adequadamente suas exigências nutricionais de micronutrientes e macronutrientes por meio da dieta (BOMFIM et al., 2020). Embora exijam quantidades relativamente reduzidas no organismo, as vitaminas e minerais são considerados micronutrientes essenciais para a manutenção da saúde humana (LI et al., 2017).

A utilização de suplementos, principalmente, na gestação é uma medida respaldada pela Organização Mundial da Saúde e incorporada pelo Ministério da Saúde como parte do cuidado pré-natal (LIMA et al., 2020). Pois, durante o período gestacional, é aconselhável incorporar suplementos de micronutrientes como um meio de complementar a ingestão nutricional (VIVEIROS et al., 2021). Visto que as gestantes apresentam uma maior suscetibilidade às carências de micronutrientes devido ao aumento das demandas nutricionais necessárias para o desenvolvimento da placenta e do feto (LI et al., 2017). Portanto, a suplementação durante esta fase inicial pode ser de crucial importância para promover o desenvolvimento da criança (MACEDO et al., 2019). Entre os suplementos mais indicados no período gestacional, encontram-se minerais e vitaminas como, por exemplo, o ácido fólico (ANHÊ et al., 2021).

2.2 ÁCIDO FÓLICO

Em 1931, Lucy Wills fez a descoberta do ácido fólico em um extrato de levedura e confirmou sua eficácia no tratamento da anemia macrocítica tropical em mulheres indianas no final da gravidez. Posteriormente, essa substância passou a ser conhecida como ácido fólico devido ao fato de ter sido isolada das folhas de espinafre (MARTINEZ et al., 2009). Além disso, também pode ser identificado pelo termo "Folato", uma designação que abrange tanto as variantes naturais da vitamina, presentes em alimentos não processados, quanto à forma sintética encontrada em suplementos medicinais e produtos alimentícios fortificados (PONTES et al., 2017). Essa substância é hidrossolúvel, reconhecida como vitamina B9 pertencente ao

complexo B e é naturalmente abundante em vegetais de folhas verdes (UEHARA et al., 2010).

No Brasil, as principais causas de óbito por anomalias congênitas que ocupavam a 5ª posição, em 1990, passaram para a 2ª principal causa em 2015 (FRANÇA et al., 2017). Como exemplo de anomalia congênita podemos citar, a falha do fechamento do tubo neural causada pela deficiência do AF (SANTOS et al., 2007). O AF, atua em várias funções fisiológicas do corpo, incluindo o metabolismo de aminoácidos, a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), no desenvolvimento do tecido nervoso e na prevenção de malformações congênitas que ocorrem durante o desenvolvimento fetal (LIMA et al., 2020).

Segundo Maia et al. (2014), durante a gravidez, o AF é fundamental, pois nesse período, há um aumento na eritropoiese, além do rápido desenvolvimento dos tecidos do feto, com isso há uma demanda por essa vitamina para suportar o processo de multiplicação celular. Dessa forma, é necessário uma nutrição e suplementação apropriada no primeiro trimestre gestacional, período que é importante para o desenvolvimento e diferenciação dos diversos órgãos fetais (MAGNO et al., 2011). Um ensaio clínico foi realizado com gestantes, durante o segundo e terceiro trimestre, ingerindo AF na dose de 400 microgramas por dia, as crianças foram avaliadas aos 3 anos de idade por meio da Escala de Desenvolvimento Infantil de Bayley e, aos 7 anos, pela Escala Wechsler de Inteligência Pré-escolar e Primária (MCNULTY et al., 2019). Esta pesquisa mostrou que crianças cujas mães utilizaram o AF tiveram melhores resultados cognitivos e melhor desempenho, quando comparadas às crianças nas quais as mães receberam placebo (MCNULTY et al., 2019).

2.3 PESTICIDAS COMERCIAIS

O Brasil é considerado o maior comprador de pesticidas do mundo e aprovou a utilização de diversos novos produtos que são proibidos em outros países (CLARKE, 2019). Cerca de 80% destes pesticidas são proibidos, no mínimo, em três países da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) da comunidade europeia, mas são liberados para a venda no Brasil (PANIS et al., 2022). Em 2020, no território brasileiro, foram comercializadas mais de 685 milhões de toneladas de pesticidas (IBAMA, 2022). Isto visa favorecer a alta produtividade agrícola (GONÇALVES et al., 2022) com o objetivo de garantir a produção eficiente dos alimentos devido à crescente população mundial (GARCÍA et al., 2022).

Além disso, são bastante utilizados desde a agricultura, como por exemplo, para o controle de pragas agrícolas, como também na área residencial, industrial (JOHNSTONE et al., 2017) e veterinária (ABDEL-DAIM; EL-GHONEIMY, 2015).

Nos últimos anos, a preocupação em relação ao uso indiscriminado de pesticidas tem aumentado (GONÇALVES et al., 2022). Ainda, a aplicação dos pesticidas visa minimizar perdas na agricultura, ocasionadas pelas pragas, e consequentemente mantém a alta produtividade agrícola (GARCÍA et al., 2022). Em consequência estes pesticidas são capazes de chegar aos recursos hídricos devido às chuvas e consequentemente serem lixiviados, ocasionando risco de efeitos tóxicos para a vida humana e aquática (ARSLAN et al., 2017). Portanto, é concedido aos poluentes químicos, como os pesticidas um alerta (OBIEDZIŃSKI e KORZYCKAIWANOW et al., 2005). No Brasil, com as realizações de testes, em 2014 foram detectadas a presença de pesticidas em 75% das águas e em 2017, este índice chegou a 92% (ARANHA et al., 2019). Por causa dessa rápida disseminação, provavelmente, ao longo dos anos, quase todas as águas das torneiras do país estarão contaminadas por pesticidas (PRADO et al., 2022).

Usuários que manipulam pesticidas podem estar expostos a quantidades maiores do que as encontradas no ambiente (LIU et al., 2018), como por exemplo, os trabalhadores agrícolas por causa da exposição ocupacional (SANTOS et al., 2022). Os pesticidas também estão presentes nos alimentos devido ao manejo do solo, entretanto é tóxico para os humanos quando estão acima dos limites máximos residuais (JARDIM et al., 2012). Segundo Prata et al. (2022), com a análises realizadas, na alimentação infantil, foram encontrados nas carnes e vegetais no mínimo um resíduo de pesticida em cerca de 85% das amostras.

Dentre os pesticidas, os inseticidas são reconhecidos devido aos seus riscos ecológicos (STOATE et al., 2009) e também aos seres humanos (LIU et al., 2018). E, dentre os inseticidas, enfatizamos os piretróides, tendo em vista que a exposição a estes pesticidas oferece riscos à saúde pública principalmente pela toxicidade crônica (GUO et al., 2018). Agora, detalharemos os piretróides evidenciando a deltametrina.

2.4 A DELTAMETRINA COMO INSETICIDA

Os piretróides são ésteres sintéticos que são extraídos do princípio ativo da flor do gênero *Chrysanthemum* sp. (STARR et al., 2008). São separados em

piretróides tipo I e tipo II, sendo a deltametrina (Del) um dos piretróides, classificado no tipo II, amplamente utilizado na agricultura (GUO et al., 2018) para a proteção de hortaliças contra pragas (MATYJASZCZYK, 2015). A Del possui uma ampla aceitabilidade para fins agrícolas (AKTAR et al., 2009) tendo em vista que é muito eficaz contra um amplo espectro de insetos (KUDER et al., 2017). A Del contamina o inseto através do contato ou pela ingestão do composto (TU et al., 2012), pois como é muito lipofílica, penetra na cutícula destes animais (ERDOGAN et al., 2011). A Del age nos neurônios dos insetos prejudicando o funcionamento dos canais de sódio dependentes de voltagem (JOHNSTONE et al., 2017) e com isso leva o animal a morte (TU et al., 2012).

2.5 TOXICIDADE DA DELTAMETRINA EM MODELOS ANIMAIS

A Del, em testes realizados com roedores, demonstrou ter efeitos tóxicos como a ação genotóxica devido ao estresse oxidativo, causando danos no DNA (MAALEJ, 2017). Ademais, a Del age interrompendo a funcionalidade do canal de sódio dependente de voltagem (JOHNSTONE et al., 2017), pois proporciona o efeito de prolongar a abertura destes canais de sódio (CHEN et al., 2017).

No experimento realizado com o *zebrafish* como modelo animal, a Del ocasionou apoptose, toxicidade no desenvolvimento embrionário, problemas cardiovasculares como as malformações, edema pericárdico, edema do saco vitelino (LI et al., 2019). Ademais, a Del pode ocasionar deformidades nas larvas, que pode estar associada ao desenvolvimento embrionário da notocorda, como a flexão do corpo, o corpo com o comprimento encurtado, diminuição na região da cabeça e áreas dos olhos de modo dose-dependente (LI et al., 2019). Além disso, com a exposição do *zebrafish* a Del, demonstrou que devido às alterações no sistema nervoso, o comportamento agressivo aumentou significativamente (STRUNGARU et al., 2019).

A pesquisa realizada por Kannarkat et al. (2015) demonstraram que a exposição à Del pode ocasionar problemas neurotóxicos como convulsão e comprometimento da memória em camundongos como modelo animal. Um exemplo disto, é que de acordo com Richardson et al. (2015), o seu experimento evidencia que a prole de camundongos expostos a Del teve problemas de memória e déficit de atenção, hiperatividade, o que se assemelha a crianças com TDAH.

2.6 RISCOS DOS PIRETRÓIDES PARA GESTANTE

Os pesticidas piretróides apesar de possuírem como finalidade a eliminação de insetos, podem também atingir espécies não-alvos, como os humanos, por serem frequentemente utilizados na agricultura, no uso doméstico e de jardinagem (BRAVO et al., 2019).

A placenta é um órgão fundamental para feto, formado durante a gravidez, pois através do sistema circulatório ocorre o fornecimento de oxigênio e nutrientes (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2020). Por meio da conexão entre a mãe e feto é possível que resíduos de pesticidas atinjam os tecidos fetais, pois os piretróides possuem alta solubilidade o que facilita a passagem pela barreira placentária (LEMONS et al., 2011).

No pré-natal, os inseticidas podem prejudicar o desenvolvimento fetal (HOCINE et al., 2016), mesmo em baixas concentrações, podendo ocasionar danos severos ao sistema nervoso (BERTON et al., 2014; GONZALEZ-ALZAGA et al., 2014).

As gestantes estão em contato com os pesticidas por meio de diversas formas (HOCINE et al., 2016). Pois, é considerado que essa exposição ocorra através da ingestão, contato com a pele e inalação, seja pelo uso doméstico ou pela proximidade com áreas de pulverização de pesticidas (BRAVO et al., 2019). Ainda, a exposição a Del pode ocorrer mesmo após o nascimento, através do leite materno (PALMA et al., 2014).

Segundo Bouwman et al. (2006), em três cidades na África do Sul, 152 amostras de leite materno foram encontradas com resíduos de piretróides. Tendo em vista que o principal receptor de pesticidas é o tecido adiposo, o leite materno serve como um ótimo indicador para medir a concentração de contaminação por resíduos de pesticidas (RACHMAWATI et al., 2021).

2.7 *Danio rerio* COMO MODELO DE INTOXICAÇÃO FETAL

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um modelo animal bastante utilizado na pesquisa científica para entender os impactos de pesticidas no desenvolvimento embrionário (STRUNGARU et al., 2019). Visto que este modelo tem uma semelhança genética com os humanos de 70% (HOWE et al., 2013) e uma fisiologia notavelmente preservada, com a maioria de seus órgãos desempenhando funções análogas às encontradas nos mamíferos (SILVA et al., 2023). Isto estabelece uma base de

comparação com a fisiologia humana, especialmente durante os estágios iniciais da vida (MACRAE CA e PETERSON RT, 2015).

O *zebrafish* tem se tornado um dos modelos mais utilizados, para avaliação do desenvolvimento embrionário na pesquisa científica (OIKONOMOU et al., 2017; LI et al., 2019). Pois, tem vantagens em comparação aos modelos murinos para avaliação do desenvolvimento embrionário, evitando processos invasivos e condições de estresse para as mães (SILVA et al., 2023). Tendo em vista que os ovos são opticamente transparentes e desenvolvimento embrionário externo (SARASAMMA et al., 2017; MILLER et al., 2018). Além disso, a fase do desenvolvimento do *zebrafish* após 24 horas, pós-fertilização, corresponde ao fim da segmentação e o início do estágio embrionário de farínghula, o que pode ser equiparado à gestação humana por volta do final do primeiro trimestre (FERNANDES et al., 2015).

A análise da biologia do desenvolvimento do *zebrafish* é uma ótima ferramenta de estudo pois proporciona vantagens devido ao seu rápido desenvolvimento, sendo possível observar o desenvolvimento de órgãos vitais em dias, diferente da triagem de roedores que levam semanas ou meses (BLOUNT et al., 2022), além do baixo custo de manutenção (MILLER et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito protetor do ácido fólico como suplemento alimentar contra a intoxicação fetal por deltametrina em modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito protetor do ácido fólico contra a intoxicação fetal por deltametrina na epibolia do *zebrafish*;
- Analisar o efeito protetor do ácido fólico contra a intoxicação fetal por deltametrina na taxa de sobrevivência do *zebrafish*;
- Avaliar o efeito protetor do ácido fólico contra a intoxicação fetal por deltametrina nos animais afetados e frequência cardíaca;
- Averiguar o ácido fólico como agente protetor contra a intoxicação fetal por deltametrina na taxa de eclosão embrio-larval do *zebrafish*.

4. METODOLOGIA

4.1 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), biotério cadastrado na plataforma do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CIUCA-CONCEA). Os procedimentos adotados para o estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, licença 6861290622.

Os animais utilizados para a reprodução foram adultos com aproximadamente 1 ano de idade, pertencentes à linhagem selvagem (WT), do plantel do Biotério do LECA. Os mesmos foram acondicionados em aquários de 80 litros, com um sistema de circulação constante de água, equipado com um mecanismo de filtragem. Os parâmetros abióticos da água foram mensurados semanalmente, com a temperatura de 26 ± 1 °C, o pH de $7,5 \pm 0,5$, o nível de oxigênio dissolvido de 11 mg/L com aeração artificial e o fotoperíodo com ciclo de 14/10 h (claro/escuro), em conformidade com as diretrizes da OCDE 236 (2013) e Santos et al. (2023). Estas condições abióticas foram mantidas durante todos os experimentos. A alimentação dos animais foi fornecida duas vezes ao dia, sendo utilizada ração extrusada de origem comercial, que apresentava um teor de proteína bruta de 30% e náuplios de artêmia recém eclodida (*Artemia* spp.).

4.2 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Os embriões foram obtidos de acordo com o protocolo de Westerfield (2000), onde os animais adultos foram alocados em aquários de desova (Zeb Clean, Alesco) na proporção de 2:1 macho/fêmea. A reprodução ocorreu no início da manhã. Após a desova, os ovos inviáveis foram descartados e os viáveis (fertilizados e não-coagulados) foram coletados aleatoriamente 30 minutos após a fecundação, e acondicionados em potes estéreis de poliestireno (capacidade de 80 mL) (OCDE 236, 2013) para a formação dos grupos experimentais. Os grupos formados foram incubados em condições físico-químicas controladas conforme descrito acima.

4.3 REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES

Foram utilizados no experimento o inseticida comercial deltametrina (Del) (Lote # 0003-21-10200, registro CAS 52918-63-5) obtido do comércio local. O ácido fólico

(AF) (Lote # WXBD4723V, registro CAS 59-30-3) foi adquirido da SIGMA (St. Louis, MO, EUA) e o solvente dimetilsufóxido (DMSO) (Lote # 85713, registro CAS 67-68-5) foi obtido da Dinâmica (Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Inicialmente foi feita uma solução estoque de deltametrina com concentração nominal de 25000 µg/L, a partir da diluição de 100 µL de Del (25g/L) em 1 mL de DMSO, em seguida foi adicionado água destilada até volume 100 mL. Desta solução estoque foi retirada uma alíquota e adicionado em 80 mL de água deionada para obter uma solução final de 500 µg/L de Del. Para produção de uma concentração final de 50 e 75 µM de AF, foi preparada uma solução estoque de AF com concentração nominal de 1000 µM, a partir da diluição de 0,50 mg de AF em 1 mL de etanol absoluto, posteriormente foi adicionado 3 mL de DMSO e homogeneizado em agitação mecânica (7 g) sendo adicionado lentamente água destilada até obter volume final de 100 mL com completa volatilização do etanol. O solvente DMSO foi obtido uma concentração final < 0,01%, que não é tóxica para o peixe.

4.4 INTOXICAÇÃO FETAL COM DELTAMETRINA

Os embriões saudáveis foram selecionados para formação dos grupos experimentais com as concentrações descritas na Tabela 1 para os experimentos de toxicidade aguda seguindo a OCDE 236 (2013). A concentração de Del utilizada como modelo para intoxicação fetal foi baseada no trabalho de Silva et al. (2023). Os embriões também foram tratados com o AF de acordo com Cadena et al. (2020) com intuito de avaliar a proteção do AF contra a intoxicação fetal pela Del.

Tabela 1. Concentrações dos compostos químicos utilizados nos testes de toxicidade aguda com exposição por 6 e 22 h.

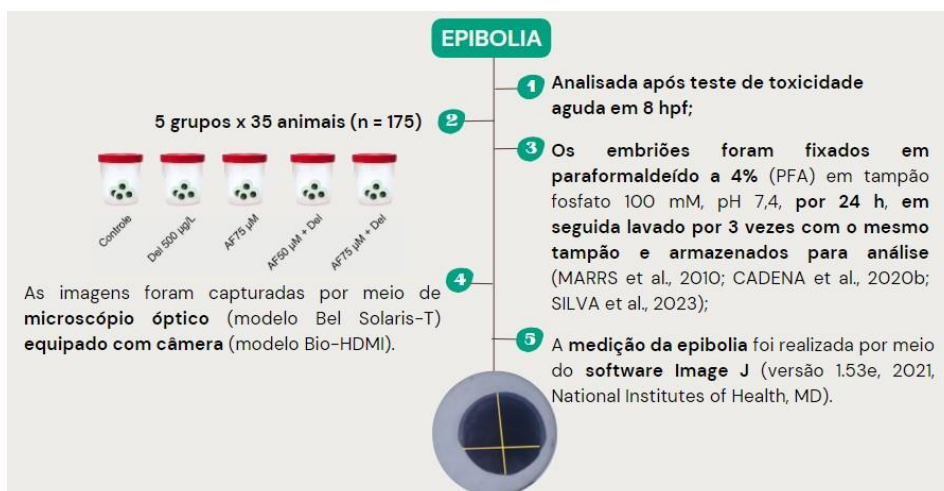
Grupo Experimental	Deltametrina (µg/L)	Ácido fólico (µM)
<i>Teste de toxicidade aguda com 6 h de exposição</i>		
Controle (Grupo Con)	0	0
Ácido fólico (Grupo AF)	0	75
Deltametrina (Grupo Del)	500	0
Ácido fólico + Deltametrina (Grupo AF50+Del)	500	50
Ácido fólico + Deltametrina (Grupo AF75+Del)	500	75
<i>Teste de toxicidade aguda com 22 h de exposição</i>		
Controle (Grupo Con)	0	0
Ácido fólico (Grupo AF)	0	75
Deltametrina (Grupo Del)	500	0
Ácido fólico + Deltametrina (Grupo AF75+Del)	500	75

Um primeiro experimento de toxicidade aguda com 6 h de exposição foi realizado para avaliação da epibolia com 8 hpf utilizando as concentrações descritas na Tabela 1. Durante essa etapa do teste, foi possível determinar quais concentrações de AF testadas teriam um efeito protetor contra a intoxicação fetal por Del. Depois, um segundo experimento foi realizado com teste de toxicidade aguda por 22 h de exposição, utilizando também as concentrações descritas na Tabela 1. Após 24 hpf, os embriões foram lavados com água destilada e mantidos em água dechlorada durante 96 hpf, com troca de água diária (OCDE 236, 2013) para a avaliação do desenvolvimento embrionário dos animais.

4.5 EPIBOLIA

A epibolia foi analisada após teste de toxicidade aguda em 8 hpf, onde foram selecionados embriões de *zebrafish* (5 grupos x 35 animais com $n = 175$), após um período exposição por 6 h conforme grupos experimentais descritos na Tabela 1. Inicialmente, os embriões foram fixados em paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, por 24 h, em seguida lavado por 3 vezes com o mesmo tampão e armazenados para análise (MARRS et al., 2010; CADENA et al., 2020b; SILVA et al., 2023). As imagens foram capturadas por meio de microscópio óptico (modelo Bel Solaris-T) equipado com câmera (modelo Bio-HDMI). A medição da epibolia foi realizada por meio do software Image J (versão 1.53e, 2021, National Institutes of Health, MD). As medições foram realizadas considerando a extensão entre o polo animal e o anel germinativo (CADENA et al., 2020b; SALES-CADENA et al., 2021).

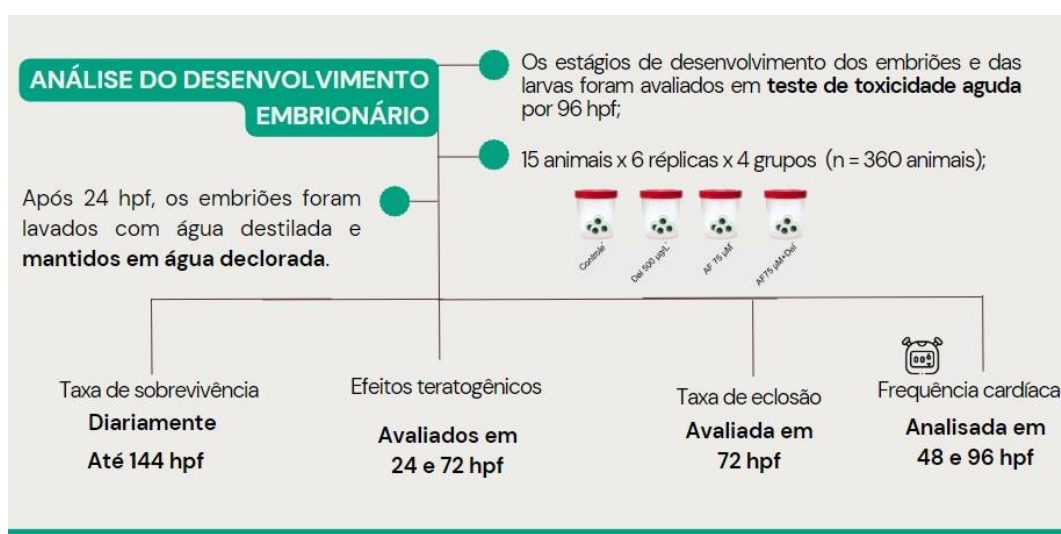
Fluxograma 1. Teste de toxicidade aguda com exposição por 6 h, para avaliação da epibolia.



4.6 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Os estágios de desenvolvimento dos embriões e das larvas foram avaliados em teste de toxicidade aguda por 96 hpf utilizando os 4 grupos experimentais conforme a Tabela 1 (15 animais x 6 réplicas x 4 grupos totalizando $n = 360$ animais). Neste estudo foi avaliado a taxa de sobrevivência, efeitos teratogênicos e frequência cardíaca. A taxa de sobrevivência foi avaliada diariamente por 144 hpf. Os efeitos teratogênicos foram avaliados em 24 e 72 hpf e foram observados a presença ou ausência de edema no pericárdio (EP), edema do saco vitelino (ESV), coagulação (CG), deformação da coluna vertebral (DCL), deformação da cauda (DCA) e atraso no desenvolvimento. Os animais foram considerados afetados quando apresentavam ao menos um dos efeitos teratogênicos citados ou mortalidade (OECD, 2013; SILVA et al., 2019; CADENA et al., 2020a; CADENA et al., 2020b, SANTOS et al., 2023). A frequência cardíaca foi analisada em 48 e 96 hpf através da contagem manual dos batimentos por 15 segundos (SILVA et al., 2019). A taxa de eclosão foi avaliada em 72 hpf, obtendo êxito quando o animal rompia a barreira do córion, com a cabeça ou com a calda (KRANERT et al., 2022). As análises foram realizadas com o auxílio de microscópio óptico Bel Photonics Solaris-T com lâmpada de LED e câmera (Hayear Mod. HY-2307 e software S-EYE 1.4.2.474).

Fluxograma 2. Teste de toxicidade aguda com exposição por 22 h, para avaliação do desenvolvimento embrio-larval.



4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando one-Way ANOVA. Quando a diferença foi significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O software utilizado para as análises estatísticas é o Origin Pro Academic 2015 (Origem Lab. Northampton, MA, EUA).

5. RESULTADOS

Os dados referentes a epibolia são apresentados na Figura 1. A partir da Figura 1, observou-se que a epibolia dos embriões de *zebrafish* no grupo controle se mantiveram dentro da normalidade (KIMMEL et al., 1995) validando os nossos resultados. Não foi observado no grupo tratado com o AF 75 μM atraso na epibolia, indicando que o AF nesta concentração não apresentou toxicidade. Entretanto, a epibolia foi significativamente reduzida na exposição a Del 500 $\mu\text{g/L}$ e o tratamento com o AF 50 μM não apresentou efeito protetor contra a intoxicação fetal por Del. Já a concentração de AF 75 μM apresentou efeito protetor contra Del mantendo a epibolia dentro da normalidade quando comparada com o grupo controle.

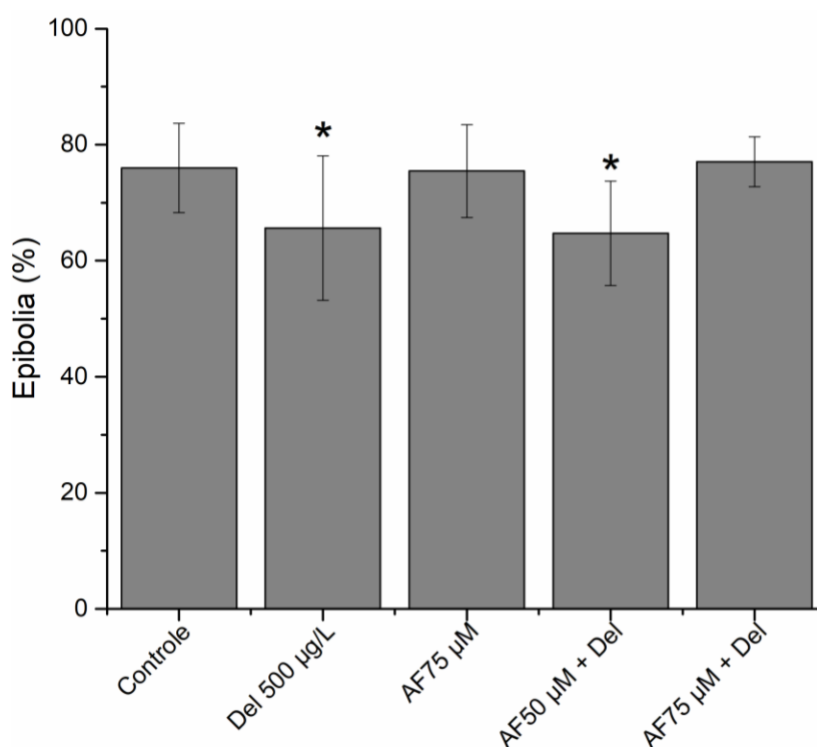


Figura 1: Percentual da epibolia de embriões de *zebrafish*, avaliados em 8 hpf, dos grupos experimentais com as concentrações de Del 500 $\mu\text{g/L}$, AF 75 μM , AF 50 μM + Del, AF 75 μM + Del por 6 h. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(4, 209) = 19,4$, $p < 0,001$). A epibolia foi considerada significativa (*) quando $p < 0,05$.

Nos resultados referentes a sobrevivência (Figura 2), observou-se que o percentual de sobrevivência dos embriões de *zebrafish* do grupo controle manteve-se na normalidade, sendo maior do que 90%, validando os nossos dados (OCDE 236, 2013). Ainda, o mesmo ocorreu com os demais grupos experimentais (Figura 2). Isto foi observado, pois o modelo de intoxicação fetal por Del usado neste trabalho se baseia no fato de que utilizamos a maior concentração que provocava o máximo de

efeitos subletais e o mínimo letais (SILVA et al., 2023). Adicionalmente, não foi visto efeito tóxico do AF nas concentrações estudadas (CADENA et al., 2020) e nem sinergia com Del.

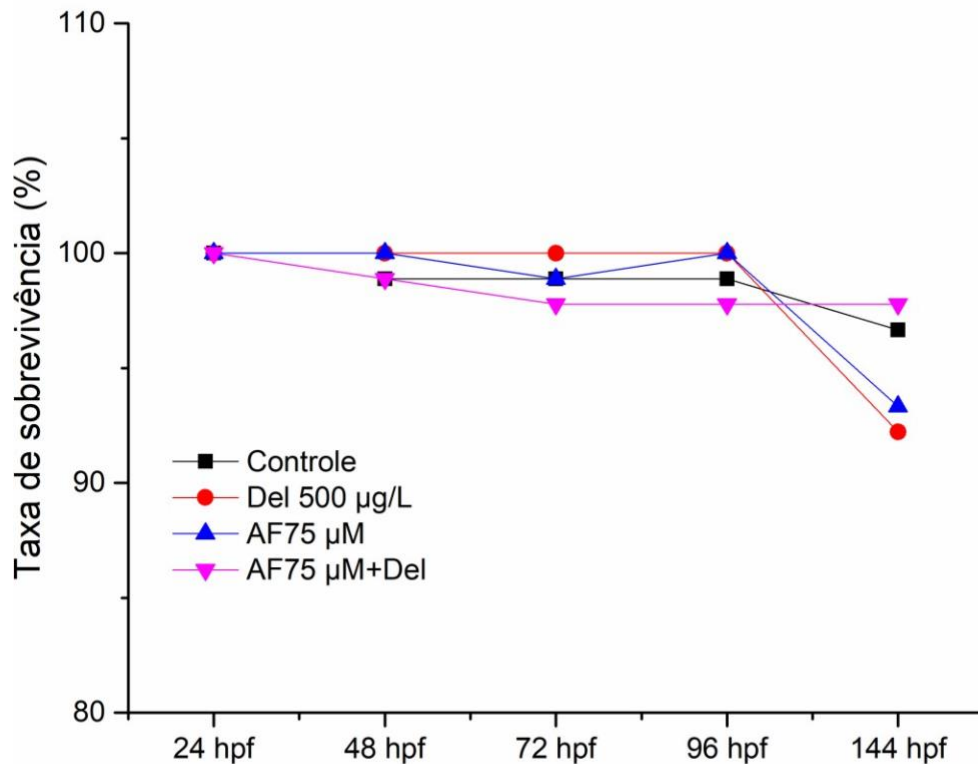


Figura 2: Taxa de sobrevivência até 144 hpf das larvas de *zebrafish* dos grupos experimentais com as concentrações de Del 500 µg/L, AF 75 µM, AF 75 µM + Del. Cada grupo experimental foi comparado ao controle por two-way ANOVA ($F(3, 119) = 0,03$, $p < 0,99$) e tempo ANOVA ($F(4, 119) = 7,05$, $p < 0,001$), foi considerada significativa (*) quando $p < 0,05$.

O resultado dos animais afetados no modelo de intoxicação fetal por Del em 24 e 72 hpf são apresentados na Figura 3 (A e B). Os animais não apresentaram efeitos teratogênicos no grupo controle. Entretanto, Del apresentou efeitos teratogênicos principalmente em 72 hpf, como edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, deformação de coluna e deformação de cauda. AF não apresentou efeitos tóxicos no período estudado e não protegeu contra os efeitos tóxicos da Del (Figura 3A e 3B).

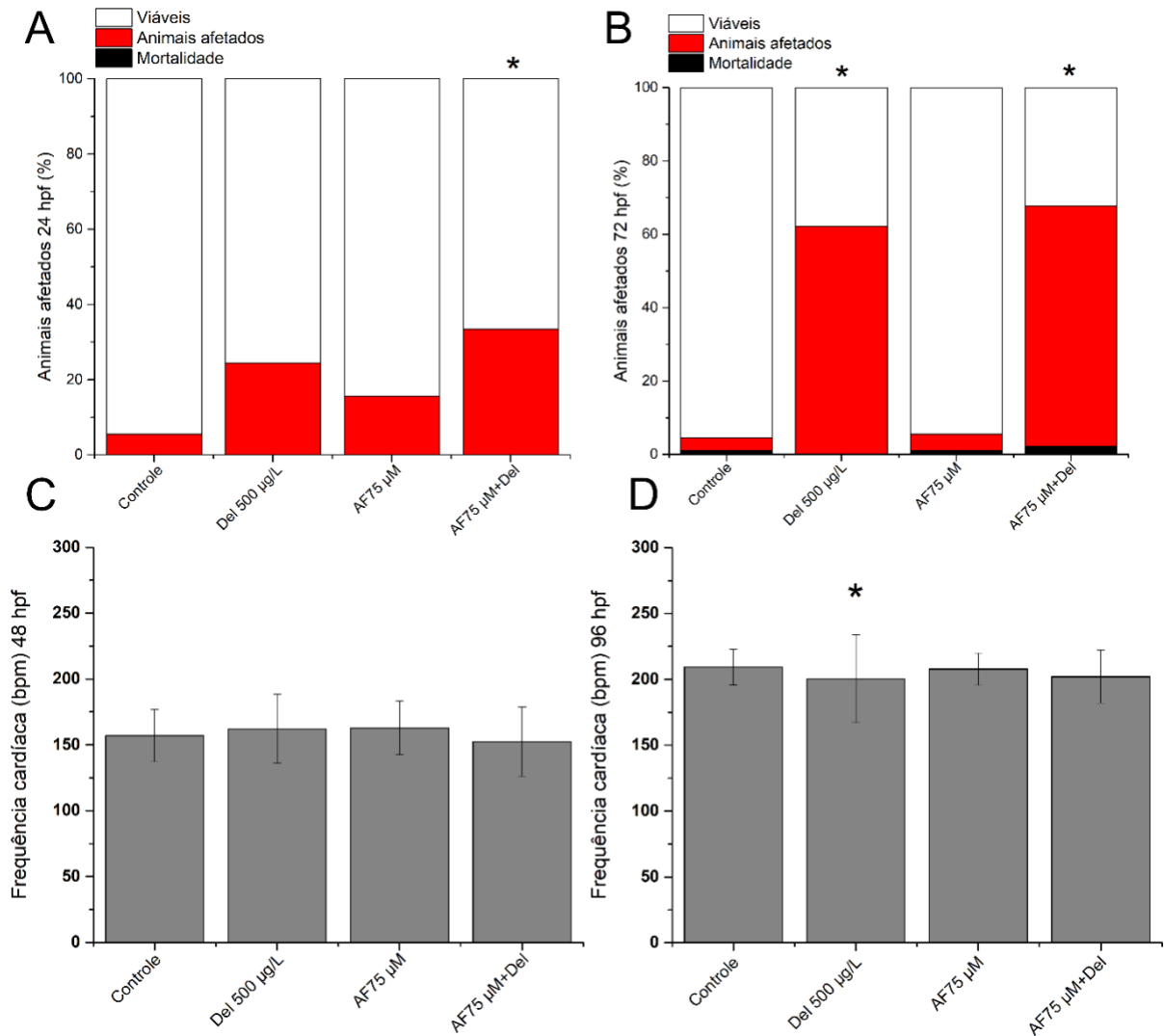


Figura 3: (A) Percentual animais afetados durante 24 hpf. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 3,77$, $p < 0,03$); (B) percentual de animais afetados durante 72 hpf. Os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 16,41$, $p < 0,001$). Os animais afetados foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$; (C) frequência cardíaca durante 48 hpf. Comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 356) = 3,81$, $p < 0,01$); (D) frequência cardíaca durante 96 hpf. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 352) = 3,58$, $p < 0,01$). Os grupos experimentais foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$.

Os dados resultantes da frequência cardíaca demonstraram que durante a 48 hpf não houveram diferenças significativas entre o controle e os demais grupos experimentais (Figura 3C). Porém, nas 96 hpf a concentração de Del 500 µg/L afetou a frequência cardíaca, pois apresentou uma redução significativa (Figura 3D). Nos grupos tratados com AF 75 µM não houve efeito tóxico nos batimentos cardíacos indicando efeito protetor contra a intoxicação fetal pela Del (Figura 3D).

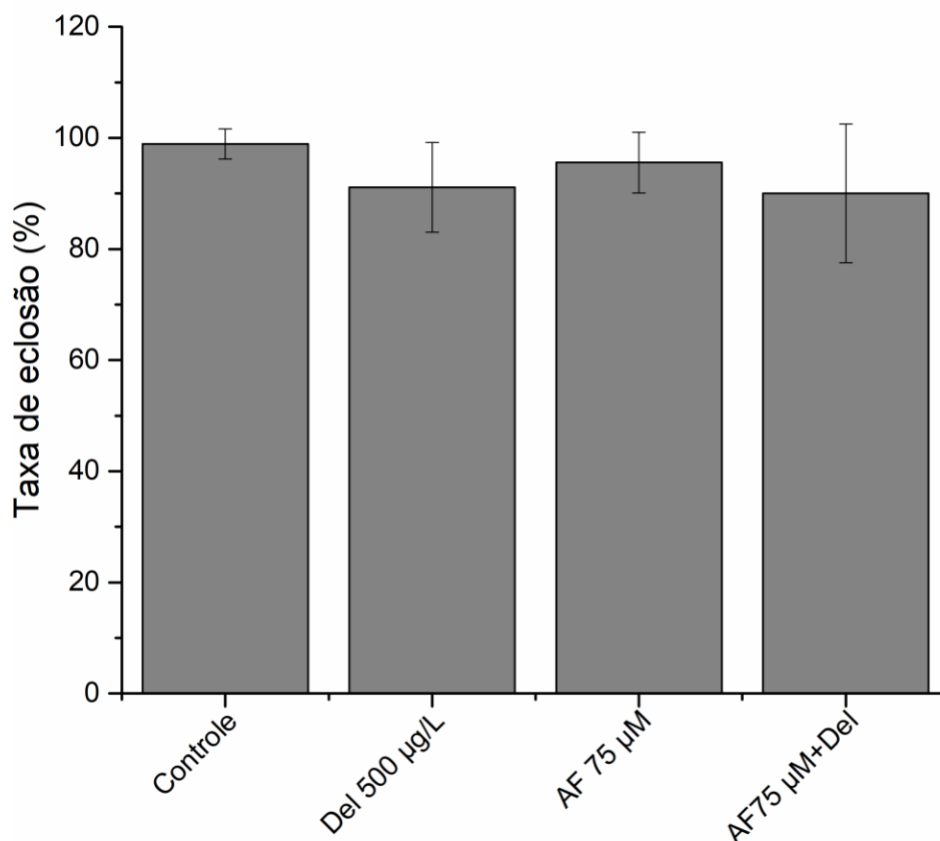


Figura 4: Percentual da taxa de eclosão do *zebrafish* em 72 hpf com as concentrações de Del 500 µg/L, AF 75 µM, AF 75 µM + Del. Todos os grupos experimentais foram comparados ao controle por one-way ANOVA ($F(3, 23) = 1,57$, $p < 0,23$). Os grupos experimentais foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$.

Analisada em 72 hpf, o percentual da taxa de eclosão apresentada na Figura 4, demonstrou que a exposição a Del e ao tratamento com o AF não influenciou na taxa de eclosão. Baseado nos resultados, observou-se que AF apresentou uma proteção parcial contra a intoxicação fetal por Del.

6. DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa, propomos o *zebrafish* como modelo para avaliar o efeito protetor do AF como suplemento alimentar contra a intoxicação fetal por Del. Devido ao fato de que o desenvolvimento inicial dos mamíferos ocorre no útero, ocorre dificuldade na avaliação dos efeitos tóxicos de compostos químicos (CADENA et al., 2020b) neste estágio do desenvolvimento. Isto leva a necessidade de desenvolver modelos alternativos para o estudo da intoxicação como visto em nosso trabalho.

Os resultados obtidos possibilitaram a análise, de modo não invasivo, do desenvolvimento embrionário do *zebrafish* e a compreensão do AF como agente de proteção aos efeitos tóxicos induzidos pela Del. O período de exposição utilizado corresponde à fase embrionária do *zebrafish* (BARS et al., 2021), que, como modelo, compartilha características epigenéticas de desenvolvimento semelhante aos mamíferos (BALASUBRAMANIAN et al., 2019), o que permite a extrapolação dos efeitos visualizados em nosso trabalho com mamíferos (SILVA et al., 2023).

Os resultados deste estudo revelaram uma significativa redução na epibolia na concentração de Del de 500 µg/L, corroborando com Silva et al. (2023), que também observou uma diminuição no percentual da epibolia ao expor o *zebrafish* a 500 µg/L de Del durante 8 hpf. Segundo Liu et al. (2018), a exposição a Del pode influenciar reduzindo a tensão superficial do córion, que, por sua vez, poderia ocasionar atrasos no desenvolvimento, incluindo o processo de epibolia. Portanto, essas informações fornecem uma fundamentação teórica para a interpretação dos efeitos tóxicos observados quando os animais foram expostos a Del na epibolia. Adicionalmente, neste estudo, os grupos tratados com AF 75 µM não apresentaram efeitos tóxicos na epibolia, sugerindo que o AF protegeu contra a intoxicação fetal por Del. De modo que é semelhante com a pesquisa em que o tratamento com o AF 75 µM não afetou na epibolia, mas protegeu contra defeitos induzidos pelo etanol (CADENA et al., 2020b). Contudo, a concentração de AF 50 µM não reduziu a toxicidade induzida pela exposição ao etanol (CADENA et al., 2020b). De maneira equivalente, o AF 50 µM não teve efeito protetor contra a intoxicação fetal induzida pela exposição a Del.

Outros autores observaram resultados semelhantes em relação aos efeitos teratogênicos encontrados em *zebrafish* quando expostos à Del, como os edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, deformação de coluna e deformação de cauda (PARLAK, 2018; LI et al., 2019; MIAO et al., 2023). Esses efeitos teratogênicos

também foram vistos em nosso estudo, o qual também foi encontrado por Silva et al. (2023) na concentração de Del 500 µg/L. Nós buscamos diminuir o percentual de animais afetados pela Del através da proteção com AF 75 µM, seguindo a abordagem adotada por Cadena et al. (2020b). Neste estudo anterior também utilizou o AF para a proteção de defeitos induzidos pelo etanol, e, embora o AF não tenha protegido completamente, demonstrou uma redução significativa no percentual de animais afetados. Diferentemente, em nossa pesquisa, não observamos este efeito protetor contra os efeitos teratogênicos induzidos pela Del isto pode indicar que a Del pode ser mais tóxica do que o etanol.

Pesquisa anterior evidenciou que a exposição a Del resultou em toxicidade cardiovascular em larvas de *zebrafish* com 72 hpf, demonstrando efeitos como a redução na frequência cardíaca (LI et al., 2019). A redução da frequência cardíaca também foi observado em nosso estudo. De acordo Ma et al. (2012) foi relatado que a suplementação de AF pode proteger contra os defeitos cardíacos induzidos pela exposição ao selenito. Ainda, também foi demonstrado em embriões de *zebrafish* que a suplementação de AF diminuiu os defeitos cardíacos induzidos por partículas finas de poluição (YUE et al., 2017). Portanto, o AF é amplamente conhecido por sua eficácia na prevenção aos defeitos cardíacos congênitos (MA et al., 2012) o que corrobora com os achados do nosso trabalho, pois o tratamento com o AF não apresentou efeito tóxico e protegeu contra os efeitos cardiotóxicos ocasionados pela Del.

Da mesma forma que foi observado por Miao et al. (2023), a exposição a Del também não afetou a eclosão dos embriões em nosso estudo. Adicionalmente, de acordo com Liu et al. (2018), nas 72 hpf, com a exposição a Del 100 µg/L ocorreu mudança na eclodibilidade, resultando no aumento da taxa de eclosão. Ainda, estes mesmos autores sugerem que a Del pode influenciar a tensão superficial do córion causando uma ruptura mais fácil. Entretanto, os mesmos trabalharam com *zebrafish* linhagem AB que é um animal mais sensível do que a linhagem selvagem (WT) usada no nosso estudo. Isto poderia justificar a diferença com os nossos resultados.

7. CONCLUSÃO

Diante do trabalho, podemos concluir que foi possível investigar o ácido fólico como suplemento alimentar contra a intoxicação fetal por deltametrina em embriões de *zebrafish*, uma vez que o modelo utilizado se mostrou adequado para analisar o efeito protetor desse suplemento alimentar. Os resultados demonstraram que nos estágios iniciais do desenvolvimento o ácido fólico apresentou efeito protetor parcial contra a intoxicação fetal, principalmente em relação a epibolia e frequência cardíaca. Portanto, é fundamental a ingestão desse suplemento pelas gestantes visto que o ácido fólico além de auxiliar no desenvolvimento do tubo neural conforme amplamente utilizado pela literatura científica, também pode agir como um protetor parcial contra a toxicidade de pesticidas como foi visto em nosso trabalho. Até o momento, não foi identificado nenhum suplemento alimentar que ofereça proteção completa contra a exposição aos pesticidas. Dessa forma, é crucial que as gestantes tomem precauções para evitar o contato com esses produtos químicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-DAIM, M.M.; EL-GHONEIMY, A. Synergistic protective effects of ceftriaxone and ascorbic acid against subacute deltamethrin-induced nephrotoxicity in rats. **Ren. Fail.**, v.37, p.297-304, 2015.

AFATA TN, et al. Evaluating the Level of Pesticides in the Blood of Small-Scale Farmers and Its Associated Risk Factors in Western Ethiopia. **Environmental Health Insights**. v.15, 2021.

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdiscip. Toxicol**, v.2, p.1-12, 2009.

ANHÊ, N. B.; PIRES, L. S. A.; GUERRA, M. T.; O uso da suplementação materna para prevenção de defeitos congênitos e outros agravos na gestação. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p.63883-63900, 2021.

ARANHA, A.; ROCHA, L. Cocktail of 27 pesticides in water of 1 out of 4 Brazilian cities. 2019. Disponível em: <<https://brazilian.report/society/2019/05/03/cocktail-pesticides-water-contamination/>> Acesso: 10 de nov de 2022.

ARSLAN, H., et al. Cypermethrin toxication leads to histopathological lesions and induces inflammation and apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Chemosphere**, v.180, p.491-499, 2017.

BALASUBRAMANIAN S, et al. Role of epigenetics in zebrafish development. **Gene**, v.718, p.144049, 2019.

BARS C, et al. Developmental Toxicity and Biotransformation of Two Anti-Epileptics in Zebrafish Embryos and Early Larvae. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.23, p.12696, 2021.

BERTON, T. et al. Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: application and characterization of foetal exposure in France. **Environ. Res.**, v.132, p.311–320, 2014.

BLOUNT, J. et al. Phenotypic and transcriptomic effects of developmental exposure to nanomolar levels of pesticides in zebrafish. **Environmental Advances**, v.7, 100151, 2022.

BOMFIM, J. H. G.; GONÇALVES, J. S. Suplementos alimentares, imunidade e COVID-19: qual a evidência?. **Vitalle –Revista de Ciências da Saúde**, Univates, Porto Alegre, Rs, Brasil, v.32, n.1, p.10-21, 2020.

BOUWMAN, H.; SEREDA, B.; MEINHARDT H.M. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. **Environmental Pollution**, v.144, p.902-917, 2006.

BRAVO, N. et al. Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticide in children from an Italian cohort (PHIME, Trieste). **Environmental Research**, v.176,

108508, 2019.

CADENA, M. R. S., et al. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae show behavioral and embryonic development defects when exposed to opioids at embryo stage. **Neurotoxicology And Teratology**, v.85, p.106964, 2021.

CADENA, P. G.; CADENA, M. R. S.; MARRS, S. S. J. Protective effects of quercetin, polydatin, and folic acid and their mixtures in a zebrafish (*Danio rerio*) fetal alcohol spectrum disorder model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 82, 106928, 2020a.

CADENA P.G, et al. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, 96, p.249-257, 2020a.

CADENA PG, et al. Protective effects of quercetin, polydatin, and folic acid and their mixtures in a zebrafish (*Danio rerio*) fetal alcohol spectrum disorder model. **Neurotoxicology and Teratology**, v.82, p.106928, 2020b.

CAI, HAOXING et al. Tributyltin causes generational neurodevelopmental toxicity and the protective effect of folic acid in zebrafish. **Journal Of Environmental Sciences**, v.137, p.615-625, 2024.

CANEDO A, et al. O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. **Ciência Animal Brasileira**, v.23, 2022.

CHEN, M. et al. Alanine to valine substitutions in the pore helix IIIP1 and linkerhelix IIIL45 confer cockroach sodium channel resistance to DDT and pyrethroids. **Neurotoxicology**, v.60, p.197–206, 2017.

CHRISTEN, V.; RUSCONI M.; CRETIAZ P.; FENT K. Developmental neurotoxicity of different pesticides in PC-12 cells in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.325, p.25–36, 2017.

CLARKE, J. S. Brazil pesticide approvals soar as Jair Bolsonaro moves to weaken rules, 2019. Disponível em: <<https://unearthed.greenpeace.org/2019/06/12/jair-bolsonarobrazilpesticides/>> Acesso: 08 de nov de 2022.

COSTA, N. et al. EXPOSURE TO TOXIC AGROCHEMICALS AND DEVELOPMENT OF CONGENITAL MALFORMATIONS: a scoping review. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v.30, p.1-18, 2021.

ERDOGAN, O. et al. Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. **Gene**, v.482, p.13-17, 2011.

ESPOLADOR, G. et al. Identificação dos fatores associados ao uso da suplementação do ácido fólico na gestação. **Rev Enferm Cent**, v.5, n. 2, p.1552-1561, 2015.

FERNANDES Y, et al. Embryonic Alcohol Exposure Impairs the Dopaminergic System and Social Behavioral Responses in Adult Zebrafish. **International Journal of**

Neuropsychopharmacology, p.1-8, 2015.

FERNANDEZ-CRUZ, T. et al. Prenatal exposure to organic pollutants in northwestern Spain using noninvasive matrices (placenta and meconium). **Science of The Total Environment**, v.731, p.138341, 2020.

FRANÇA, E. B. et al. Leading causes of child mortality in Brazil, in 1990 and 2015: estimates from the Global Burden of Disease study. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.20, n.1, p.46-60, 2017.

FUKUSHIMA, H et al. Potenciais usos do modelo animal *zebrafish* (*Danio rerio*) em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.18, n.1, 2020.

GARCÍA, M.G. et al. Review: Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. **Science of the Total Environment**, v.845, 157291, 2022.

G. OIKONOMOU, D. A. PROBER, Attacking sleep from a new angle: Contributions from zebrafish. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.44, p.80–88, 2017.

GONÇALVES, C.R. et al. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. **Environmental Advances**, v.8, 100220, 2022.

GONZALEZ-ALZAGA, B. et al. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. **Toxicol. Lett.**, v. 230, p.104–121, 2014.

GUO, XC. et al. Perfluorododecanoic acid exposure induced developmental neurotoxicity in zebrafish embryos. **Environ Pollut.**, v.241, p.1018– 1026, 2018.

HOCINE, L. et al. The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.134, p.49-54, 2016.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, p.498-503, 2013.

IBAMA - Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources. Annual bulletins of production, import, export and sales of pesticides in Brazil, 2022. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-kude-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso: 09 de nov 2022.

JARDIM, A. N. O. et al. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v.25, p.607-616, 2012.

JOHNSTONE, A.F.M. et al. Effects of an environmentally-relevant mixture of pyrethroid insecticides on spontaneous activity in primary cortical networks on microelectrode arrays. **Neurotoxicology**, v.60, p.234–239, 2017.

KANNARKAT, G.T., et al. Common genetic variant association with altered HLA Expression, synergy with pyrethroid exposure, and risk for Parkinson's disease: an observational and case-control study. **NPJ Parkinsons Dis.**, v.1, 2015.

KIMMEL CB, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v.203, n.3, p.253-310, 1995.

KRANERT, K. et al. MiR92b-3p synthetic analogue impairs zebrafish embryonic development, leading to ocular defects, decreased movement and hatching rate, and increased mortality. **Journal Of Applied Genetics**, v.64, n.1, p.145-157, 2022.

KUDER, R. S.; PHILIP, G. H. Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in liver and ovary of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to deltamethrin. **Chemistry and Ecology**, v.33, n.8, p.739-749, 2017.

LEMOS, A. J. J. M. et al. Response of blastocyst–endometrium interactions in albino rats to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. **Food And Chemical Toxicology**, v.49, n.10, p.2541-2547, 2011.

LI, M.; LIU, XY.; FENG, XZ. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Chemosphere**, v.219, p.155–164, 2019a.

LI, Z. et al. Effects of prenatal micronutrient supplementation on spontaneous preterm birth: a double-blind randomized controlled trial in China. **Am J Epidemiol**, v.186, n. 3, p.318-325, 2017.

LIMA, R. M. et al. Prevalência e Fatores associados ao uso de Ácido Fólico e ferro em gestantes da coorte BRISA. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.20, n.3, 2020. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/rbsmi/a/W3H7jSTSbdJTmXJC69QLvdJ/?lang=pt#ModalArticle>
 s>. Acesso em: 25 de agost. 2023.

LIU, S. et al. Effect of folic acid food fortification in Canada on congenital heart disease subtypes. **Circulation** 134 (9), p.647-655, 2016.

LIU, X. et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): a comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. **Chemosphere**, v.199, p.16-25, 2018.

LUO H, et al. Long term perinatal deltamethrin exposure alters electrophysiological properties of embryonic ventricular cardiomyocyte. **Current Medical Science**, v.39, p.21-27, 2019.

MAALEJ, A., et al. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Food Chem. Toxicol.**, v.106, p.455-465, 2017.

MA, Y. et al. Embryonic developmental toxicity of selenite in zebrafish (*Danio rerio*)

and prevention with folic acid. **Food And Chemical Toxicology**, v.50, n.8, p.2854-2863, 2012.

MACEDO, C. et al. A importância dos micronutrientes no desenvolvimento neurocognitivo da gestação a infância. **Rev. Uningá**, v.56, n.4, p.145-155, 2019.

MACRAE CA e PETERSON RT. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 14: p.721-731, 2015.

MAIA, T. L.; TREVISOL, F. S.; GALATO, D. Uso de medicamentos no primeiro trimestre de gravidez: avaliação da segurança dos medicamentos e uso de ácido fólico e sulfato ferroso. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia, Tubarão**, p. 541-547, 2014.

MAGNO M. A. C. B. et al. Saúde da gestante e do feto: ingestão de micronutrientes essenciais versus utilização de substâncias prejudiciais – um estudo em Belo Horizonte (MG). **HU Revista**, Juiz de Fora, v.37, n.4, p. 441-448, 2011.

MARCHIONI, D et al. Ingestão de folato nos períodos pré e pós-fortificação mandatória: estudo de base populacional em São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.29, n.10, p.2083-2092, 2013.

MARRS, J.A. et al. Zebrafish fetal alcohol syndrome model: effects of ethanol are rescued by retinoic acid supplement. *Alcohol* (Fayetteville, NY) 44, p.707–715, 2010.

MARTINEZ, C. et al. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, v.201, n.4, p. 394e1-394e11, 2009.

MATYJASZCZYK, E. Prevention methods for pest control and their use in Poland. **Pest Manag. Sci.**, v.71, p.485-491, 2015.

MCNULTY, H. et al. Effect of continued folic acid supplementation beyond the first trimester of pregnancy on cognitive performance in the child: a follow-up study from a randomized controlled trial (FASSTT Offspring Trial). **BMC Medicine**, v.17, n.1, p.196, 2019.

MIAO, W. et al. Systematic evaluation of the toxicological effects of deltamethrin exposure in zebrafish larvae. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v.100, p.104155, 2023.

MILLER, GW.; CHANDRASEKARAN, V.; YAGHOUBI, B.; LEIN, PJ. Opportunities and challenges for using the zebrafish to study neuronal connectivity as an endpoint of developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v.67, p.102–111, 2018.

M.S. RAHMAN.; S.M.M. ISLAM.; A. HAQUE.; M. SHAHJAHAN. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish, **Toxicol. Rep.**, v.7, p.317–323, 2020.

OBIEDZIŃSKI, M.W.; KORZYCKA-IWANOW, M. Chemical food contaminants-critical

factors of food quality and safety. **Przemysł Spożywczy**, v.47, p.841–847, 2005.

OCDE236. OCDE GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. OCDE. 2013; 236, p.1-22.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Diretriz: suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes. Genebra: OMS; 2013.

PALMA DCA, et al. Simultaneous determination of different classes of pesticides in breast milk by solid-phase dispersion and GC/ECD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, n.8, p.1419-1430, 2014.

PANIS, C et al. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. **Front. Public Health.**, v.9, p.787438, 2022.

PARLAK V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. **Chemosphere**, v.207, p.397-403, 2018.

PRADO, L.; ALBILDTRUP, J. Landowners' willingness to accept pesticide reduction in the Pípiripau River Basin (Brazil). **Environmental Challenges**, v.9, 100607, 2022.

PRATA, R. et al. Targeted and non-targeted analysis of pesticides and aflatoxins in baby foods by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. **Food Control**, v.139, 109072, 2022.

PONTES, E. L. B.; PASSONI, C. M. S.; PAGONOTTO, M. (2017). Importância do ácido fólico na gestação: requerimento e biodisponibilidade. **Cadernos da Escola de Saúde**. Disponível em: <https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2232>.

PONTES, G. et al. Fatores associados a suplementação de ácido fólico em gestantes atendidas em uma maternidade filantrópica. **revista cereus**, v.13 (1), p.115–126, 2021. Disponível em: <http://ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/view/3346>.

RACHMAWATI, I.; HERNAWATI, S.; SLISTYANINGSIH, E.; MUHAMMAD, A.C. Risk Factors for Contamination of Pesticide Residues in Women's Breast Milk Farmers in Agricultural Areas. **Strada Jurnal Ilmiah Kesehatan**, v.10, p.596-604, 2021.

RICHARDSON, J.R et al. Developmental pesticide exposure reproduces features of attention deficit hyperactivity disorder. **FASEB J**, v.29, p.1960-1972, 2015.

SANTOS, L. et al. Genomic instability evaluation by BMCyt and telomere length in Brazilian family farmers exposed to pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.878, 503479, 2022.

SANTOS, L.; PEREIRA, M. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.1, p.17-24, 2007.

SANTOS, T. et al. Single and joint toxic effects of thyroid hormone, levothyroxine, and amiodarone on embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology**, v.32, n.4, p.525-535, 2023.

SARASAMMA S. et al. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario, 2017.

SILVA, J.F. et al. Modelo de zebrafish (*Danio rerio*) para intoxicação fetal por deltametrina. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.23, n.4, p.1-11, 2023.

SILVA M.C.G, et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 214: 330-340, 2019.

SILVA, P.F .et al. Different housing conditions for zebrafish: what are the effects?. **Behavioural Processes**, v.209, p.104886, 2023.

SORNAT, R. et al. Developing a screening test for toxicity studies of prenatal development with the use of *Hydra attenuata* and embryos of zebrafish. **Toxicology Reports**, v.8, p.1742- 1753, 2021.

STARR, J. et al. Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. **Environmental Research**, v.108, n.3, p.271–279, 2008.

STOATE, C. et al. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe e a review. **J. Environ. Manage.**, v.91, p.22-46, 2009.

STRUNGARU, S. et al. Toxicity and chronic effects of deltamethrin exposure on zebrafish (*Danio rerio*) as a reference model for freshwater fish community. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.171, p.854-862, 2019.

SYED, O. A. et al. A perspective on psychedelic teratogenicity: the utility of zebrafish models. **Trends In Pharmacological Sciences**, v.44, n.10, p.664-673, 2023.

TU, H.T et al. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Chemosphere.**, v.86, p.83–91, 2012.

UEHARA, S. et al. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Revista de Nutrição**, v.23, n.5, p.881-894, 2010.

VIVEIROS, Frederico et al. Perfil de suplementação antes e durante a gestação: estudo de acompanhamento na ilha do Faial. **Acta Portuguesa de Nutrição**, v.26, n.1, p.6-9, 2021.

WESTERFIELD M. THE ZEBRAFISH BOOK, 5th Edition. Oregon: Eugene, 2000.

YOUSSEF M.I.; AWAD T.I.; MOHAMED E.H. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. **Toxicology**, v. 227, p.240-247, 2006.

YUE, C et al. Protective effects of folic acid on PM2.5-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/beta-catenin signal pathways. **Environ. Toxicol.** 32 (10), p.2316-2322, 2017.

ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO 6861290622



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v14/07/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 14/07/2023) da proposta intitulada "Estudo dos efeitos tóxicos da deltametrina e outros pesticidas e proposição de alternativas neuroproteroras contra intoxicação por deltametrina em modelo de zebrafish (Danio rerio)", CEUA nº 6861290622 (ID 076761), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena** e equipe; *Aline Amanda da Silva; Andressa Raphaely de Lima Silva; Emilay Natália Silva do Nascimento; Jadson Freitas da Silva; Katarine Evelyn Falcão e Falcão; Maria Letícia Santos Carnáuba da Silva; Renatta Priscila Ferreira Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) em 09/08/2023.

Pedido apresentado à CEUA: Enviamos relatório parcial e estamos solicitando autorização para que novos discentes possam fazer parte da referida pesquisa com animais. Estamos anexando através desta emenda, a comprovação de capacitação da equipe.

Considerações da CEUA: Após análise da solicitação de Emenda da licença CEUA Nº 6861290622, esta Comissão em Reunião Colegiada ordinária decidiu por manter o parecer do relator como APROVADA.

Término previsto: 09/2024

Origem: Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA

Espécie: Peixes

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 0 a 144 horas

Quantidade
mantida: 0

Linhagem: Variadas

Peso: 0 a 1 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Peixes	Machos e Fêmeas	2700	0