

FÁBIO JONAS DE SOUZA SOARES

**USO DO COMPLEXO METÁLICO Mg-FERÚLICO PARA ATENUAR OS
EFEITOS DO FIPRONIL SOBRE CARACTERÍSTICAS
COMPORTAMENTAIS EM *ZEBRAFISH* ADULTO**

JEQUIÉ – BA

MAIO/ 2024

FÁBIO JONAS DE SOUZA SOARES

**USO DO COMPLEXO METÁLICO Mg-FERÚLICO PARA ATENUAR OS EFEITOS DO
FIPRONIL SOBRE CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS EM *ZEBRAFISH*
ADULTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Jequié, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva

JEQUIÉ – BA

MAIO / 2024

S676u Soares, Fábio Jonas de Souza

Uso do complexo metálico Mg-ferúlico para atenuar os efeitos do fipronil sobre características comportamentais em *Zebrafish* adulto / Fábio Jonas de Souza Soares.- Jequié, 2024.
52f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, sob orientação do Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva)

1.Complexo de magnésio 2.Estresse oxidativo 3.*Zebrafish* 4.Estudo comportamental I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

TERMO DE APROVAÇÃO

FÁBIO JONAS DE SOUZA SOARES

“Uso do Complexo Metálico Mg-Ferúlico para Atenuar os efeitos do Fipronil sobre Características Comportamentais em Zebrfish Adulto”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ELDEVAN DOS SANTOS SILVA**
Data: 18/06/2024 22:40:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profº. Drº. Eldevan dos Santos Silva
(UFSCAR, São Carlos – SP, 2017)
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **NADJA FERREIRA RABELO DE MELO**
Data: 19/06/2024 00:12:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. Nadja Ferreira Rabelo de Melo
(UNIMONTES, Montes Claros – MG, 2024)

Documento assinado digitalmente
 **CARLA LARISSA COSTA MEIRA**
Data: 17/06/2024 22:05:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. Carla Larissa Costa Meira
(UFBA, Salvador – BA, 2023)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em ____ / ____ / ____

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Eldevan dos Santos Silva, que muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À UNIFG | CESG Centro De Educação Superior De Guanambi SA pela oportunidade de realização de parte do mestrado e pelo fornecimento de laboratórios de Química e Biotério e pela colaboração nos trabalhos experimentais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À equipe do Biotério da UNIFG, pelas colaborações nas análises e acompanhamento do projeto.

À Nelson da Anel Farma e ao Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LAFIB) da Ufscar, pela doação de drogas e parcerias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Zebrafish adulto (Danio rerio). Modelo animal amplamente utilizado em pesquisas científicas devido à sua transparência durante o desenvolvimento embrionário, facilidade de manipulação genética e rápida reprodução.....	14
Figura 2.	Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando a formação das espécies reativas do oxigênio: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil.....	16
Figura 3.	Estrutura química dos ácidos ferúlico e gálico.....	18
Figura 4.	Estabilização de radical fenoxil do análogo de vitamina E, por meio do complexo de Mg^{2+}	20
Figura 5.	Estrutura química do bisfenol A.....	22
Figura 6.	Estrutura química do fipronil.....	24
Figura 7.	Estrutura química da fluoxetina.....	25
Figura 8.	Estrutura química da imipramina.....	26
Figura 9.	Fluxograma do delineamento experimental.....	29
Figura 10.	Teste de exposição ao predador.....	32
Figura 11.	Ilustração do modelo esquemático do aparato comportamental utilizado no teste de agressividade induzida por espelho.....	32
Figura 12.	Esquema do aquário de acrílico fosco, com a metade clara e outra escura, com portas deslizáveis no centro.....	33

Figura 13.	Teste de interação social.....	34
Figura 14.	Tempo do lado escuro (A) e latência (B) de peixes <i>Danio rerio</i> em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 µg/L) (FIP)	36
Figura 15.	Número de cruzamentos (A) e interação social (B) de peixes <i>Danio rerio</i> em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 µg/L) (FIP)	37
Figura 16.	Número de episódios de agressividade (A) e tempo de episódios de agressividade (B) de peixes <i>Danio rerio</i> em função dos tratamentos controle (CT) (...).....	39
Figura 17.	Número de episódios de agressividade (A) e tempo de episódios de agressividade (B) de peixes <i>Danio rerio</i> em função dos tratamentos controle (CT) (...).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos tratamentos.....	29
Tabela 2.	Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para as características tempo do lado escuro (TLE), latência (LAT), número de cruzamentos (NC)	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS+	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico;
AChE:	Acetilcolinesterase;
ANOVA:	Análise de variância;
BPA:	Bisfenol;
CV:	Coeficiente de variação para as características;
CT:	Controle positivo;
DCNT:	Doenças Crônicas Não Transmissíveis;
DNA:	Ácido desoxirribonucleico;
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazil;
ECOD:	7-etoxicumarina O-desetilase;
FIP:	Fipronil;
FL:	Fluoxetina;
GABA:	Ácido gama-aminobutírico;
GSH:	Glutathione;
IM:	Imipramina
IS:	Interação social;
IUPAC:	União Internacional de Química Pura e Aplicada:
LAT:	Latência;
Mg:	Magnésio;
NA	Noradrenalina;
NC:	Número de cruzamentos;
NEA:	Número de episódios de agressividade;
ROS:	Espécies reativas de oxigênio;
RSN:	Espécies reativas de nitrogênio;
SNK:	Student-Newman-Keuls:
TEA:	Tempo de episódios de agressividade;
TLE:	Tempo do lado escuro;
TPP:	Tempo de proximidade ao predador;
TRAT:	Tratamentos;
VM:	Velocidade média.

RESUMO

Uso do complexo metálico Mg-ferúlico para atenuar os efeitos do fipronil sobre características comportamentais em *Zebrafish* adulto

Autor: Fábio Jonas de Souza Soares

Orientador: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva

O fipronil é um inseticida que atua na inibição do sistema nervoso central (SNC) dos insetos e possui efeitos nocivos sobre vertebrados não-alvo. Em espécies aquáticas, como o *Zebrafish*, o fipronil induz ao estresse oxidativo, além de alterações bioquímicas e comportamentais. Entretanto, a utilização de ácidos fenólicos simples coordenados com íons metálicos pode ser uma alternativa para atenuar os efeitos do estresse oxidativo, devido à sua maior atividade antioxidante. Desta forma, avaliamos o efeito do complexo antioxidante metálico Mg-ferúlico na atenuação dos efeitos do fipronil sobre o comportamento do peixe *Danio rerio* adulto. O estudo foi conduzido no Biotério do Centro Universitário UNIFG-FG em Guanambi Bahia, utilizando 50% dos animais fêmeas e 50% machos com idade de 10 a 12 meses. O estudo foi realizado com seis grupos de tratamentos, sendo eles: controle negativo, mantidos em água do biotério (CT), controle positivo, tratados com a droga de referência fluoxetina (FL), tratados apenas com o fipronil (FIP), tratados com fipronil e solução de Mg-ferúlico associado ao ácido gálico (FIP1 e 2) e tratados com fipronil e com solução de Mg-ferúlico (FIP3). As exposições dos peixes nas drogas foram realizadas por imersão até 72. A fluoxetina foi utilizada na concentração de 6 mg/L, o fipronil de 100 µg/L, Mg-ferúlico 15 mg/L e ácido gálico 30 mg/L. Para cada tratamento foram utilizados 10 peixes por grupo, os quais foram mantidos em aquário de dimensões 50 × 25 × 30 cm, isolados do biotério por um período de aclimação de 5 dias. Após os tratamentos, os peixes foram avaliados individualmente quanto às características comportamentais: tempo do lado claro/escuro, latência, cruzamentos, interação social, velocidade média, tempo de proximidade ao predador, número de episódios de agressão e duração da agressão. A aplicação de fipronil resultou na redução no número de cruzamentos, interação social, velocidade média e no número e duração de episódios de agressividade de peixes *Danio rerio* adulto. A aplicação de Mg-ferúlico antes ou após a aplicação de fipronil atenuou seus efeitos nocivos sobre as características comportamentais de interação social, velocidade média e agressividade de peixes *Danio rerio*.

Palavras-chave: Complexo de magnésio, estresse oxidativo, atividade antioxidante, *Zebrafish*, estudo comportamental.

ABSTRACT

Use of the Mg-ferulic metal complex to attenuate the effects of fipronil on behavioral characteristics of adult Zebrafish

Author: Fábio Jonas de Souza Soares

Advisor: Prof. Dr. Eldevan dos Santos Silva

Fipronil is an insecticide that acts to inhibit the central nervous system (CNS) of insects and has harmful effects on non-target vertebrates. In aquatic species, such as Zebrafish, fipronil induces oxidative stress, in addition to biochemical and behavioral changes. However, the use of simple phenolic acids coordinated with metal ions may be an alternative to mitigate the effects of oxidative stress, due to their greater antioxidant activity. In this way, we evaluated the effect of the Mg-ferulic metal complex in attenuating the effects of fipronil on the behavior of adult *Danio rerio* fish. The study was conducted in the Animal House of the UNIFG-FG University Center in Guanambi Bahia, with 50% of the animals being female and 50% being males aged 10 to 12 months. The study was carried out with six treatment groups, namely: negative control, kept in vivarium water (CT), positive control, treated with the reference drug fluoxetine (FL), treated only with fipronil (FIP), treated with fipronil and Mg-ferulic solution associated with gallic acid (FIP1 and 2) and treated with fipronil and Mg-ferulic solution (FIP3). Fish were exposed to drugs by immersion up to 72°C. Fluoxetine was used at a concentration of 6 mg/L, fipronil at 100 µg/L, Mg-ferulic acid at 15 mg/L and gallic acid at 30 mg/L. For each treatment, 10 fish per group were used and kept in an aquarium measuring 50 × 25 × 30 cm, isolated from the vivarium for an acclimatization period of 5 days. After the treatments, the fish were evaluated individually for behavioral characteristics: time on the light/dark side, latency, crossings, social interaction, average speed, proximity time to the predator, number of aggression episodes and duration of aggression. The application of fipronil resulted in a reduction in the number of crossings, social interaction, average speed and the number and duration of aggressive episodes of adult *Danio rerio* fish. The application of Mg-ferulic acid before or after the application of fipronil attenuates its harmful effects on the behavioral characteristics of social interaction, average speed and aggressiveness of *Danio rerio* fish.

Keywords: Magnesium complex, oxidative stress, antioxidant activity, Zebrafish, behavioral study.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Radicais livres.....	14
2.2 Estresse oxidativo	15
2.2 Ácido ferúlico e ácido gálico.....	17
2.3 Magnésio.....	19
2.4 Complexos de Mg (II)	21
2.5 Bisfenol como neuroindutor.....	22
2.6 Fipronil como neuroindutor.....	23
2.7 Fluoxetina e Imipramina	24
2.8 Comportamento do <i>Danio rerio</i>	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Criação dos peixes e tratamentos.....	28
4.2 Análise comportamental.....	31
4.2.1 Exposição ao predador	31
4.2.2 Agressividade (teste do espelho)	32
4.2.3 Teste de claro-escuro.....	33
4.2.4 Interação social	33
4.3 Análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	40
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

O fipronil (5- amino- 1- (2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinil-pirazol-3-carbonitrila) é um inseticida fenilpirazol de amplo espectro, utilizado para controle de insetos praga (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). O uso incorreto ou generalizado do fipronil pode ocasionar a contaminação da água e do solo, através do processo de lixiviação. Devido à solubilidade alta a moderada, o potencial de lixiviação e a persistência do fipronil representam um risco contínuo e crescente para ambientes aquosos (BONMATIN *et al.*, 2014).

O fipronil e os compostos resultantes de sua degradação podem ser encontrados em cursos de água em concentrações que representam um risco para uma ampla variedade de invertebrados fluviais (WESTON; LYDY, 2014). Há evidências crescentes de que o fipronil pode causar uma variedade de efeitos tóxicos em animais e seres humanos, tais como neurotóxico, hepatotóxico, nefrotóxico, efeitos reprodutivos e citotóxicos (WANG *et al.*, 2016).

A exposição a contaminantes aquáticos pode impactar comportamentos que são essenciais para a sobrevivência de organismos aquáticos (BEVILAQUA *et al.*, 2020). A avaliação do comportamento do Zebrafish adulto permite observações da atividade neurotóxica de contaminantes, mesmo em pequenas concentrações (CUENCA *et al.*, 2022). O Zebrafish adulto quando exposto ao fipronil em concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/L}$ apresentam alterações comportamentais que resultam de estresse oxidativo, inflamação e apoptose (WU *et al.*, 2021).

Vários estudos evidenciam que o estresse oxidativo pode está diretamente envolvido na toxicidade induzida pelo fipronil (KHAN *et al.*, 2015; BEVILAQUA *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021), o que pode alterar o sistema antioxidante de defesa e levar a danos às macromoléculas celulares, como lipídios, DNA e proteínas (WEIDINGER e KOZLOV 2015; WANG *et al.*, 2016).

Estudo com larvas do Zebrafish após exposição a altas concentrações de fipronil (100 e 1000 $\mu\text{g/L}$) ocasionaram o desenvolvimento anormal (XU *et al.*, 2018) e alterações moleculares relacionadas à adaptação claro-escuro, detecção do fotoperíodo e ao ritmo circadiano (EADIE *et al.*, 2020). Além disso, foi observado efeitos no comportamento tipo ansiolítico (CUENCA *et al.*, 2022) e alterações comportamentais no sistema sensorial e motor, causando uma diminuição significativa na velocidade e distância da trajetória de natação (WU *et al.*, 2021).

O Zebrafish (Figura 1) tem sido utilizado como modelo animal experimental para explorar tanto os efeitos tóxicos como para avaliar os efeitos benéficos de determinados compostos (STEGEMAN *et al.*, 2010). Neste estudo, avaliamos o efeito do íon metálico do Mg^{2+} contendo o ácido ferúlico (complexo Mg-ferúlico) na atenuação dos efeitos do fipronil sobre o comportamento do Zebrafish adulto.

Figura 1 - Zebrafish adulto (*Danio rerio*). Modelo animal amplamente utilizado em pesquisas científicas devido à sua transparência durante o desenvolvimento embrionário, facilidade de manipulação genética e rápida reprodução.



Fonte: autor, (2024).

O ácido ferúlico pertence ao grupo do ácido fenólico comumente encontrado em tecidos vegetais e tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética devido a suas propriedades antioxidantes, que são relacionadas à eliminação de radicais livres, à ligação de metais de transição e prevenção da peroxidação lipídica (ZDUŃSKA *et al.*, 2018).

Ácidos fenólicos coordenados à íons metálicos podem exibir maior atividade antioxidante do que os ligantes sozinhos devido à sua capacidade de atuar como estabilizadores de radicais livres, como verificado por Kalinowska *et al.* (2021) para o complexo de ácido ferúlico com íons metálicos $Mg(II)$ e $Mn(II)/Na(I)$. Outra alternativa de sucesso, é a utilização de compostos associados ao ácido gálico. O ácido gálico é um composto fenólico antioxidante que possui atividades antiapoptóticas e neuroprotetora (DAGLIA *et al.*, 2014, BALDIN *et al.*, 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres

Os radicais livres desempenham um papel duplo no corpo humano, atuando tanto como espécies benéficas quanto deletérias (SEN *et al.*, 2010). Em

concentrações normais, os radicais livres estão envolvidos em diversos processos como na formação de energia, ajuste do crescimento celular, fagocitose, síntese de substâncias biológicas essenciais e na sinalização intercelular (PREVEDELLO; COMACHIO, 2021). Porém, em excesso ocasiona o estresse oxidativo, um processo prejudicial que pode ocasionar danos em biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas (KOSTOVA; BALKANSKY, 2013), com implicações diretas sobre a etiologia de inúmeras enfermidades crônicas em humanos, tais como: a aterosclerose, diabetes, obesidade, câncer e distúrbios neurológicos (RUBIN, 2011; BRENT; 2013; SEACHRIST *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019).

A produção de radicais livres nos seres vivos é controlada por mecanismos de defesa que envolve a produção de enzimas antioxidantes. Além disso, compostos antioxidantes exógenos também contribuem para o controle dos seus efeitos nocivos (VASCONCELOS, *et al.*, 2014). Desta forma, alguns estudos têm sido desenvolvidos buscando associar os efeitos cooperativos de metais e compostos antioxidantes para melhorar a capacidade de sequestro de radicais livres (KOSTOVA; BALKANSKY, 2013).

2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre os níveis de compostos pró-oxidantes e antioxidantes, com predomínio dos primeiros. O estado pró-oxidante vem sendo relacionado a várias patologias, como doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e cânceres, ora como sua causa, em alguns casos como consequência (VELLOSA *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos relacionados à patogênese das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que são as principais causas de morbimortalidade em pessoas idosas, destacam-se as alterações no metabolismo oxidativo. Estudos realizados para averiguar o papel desse, na patogênese dessas doenças, verificaram-se que apresentou associação direta entre a quebra da hemóstase do metabolismo oxidativo e consequentemente o aumento do risco para DCNT (GOTTLIEB; MORASSUTTI; CRUZ, 2011).

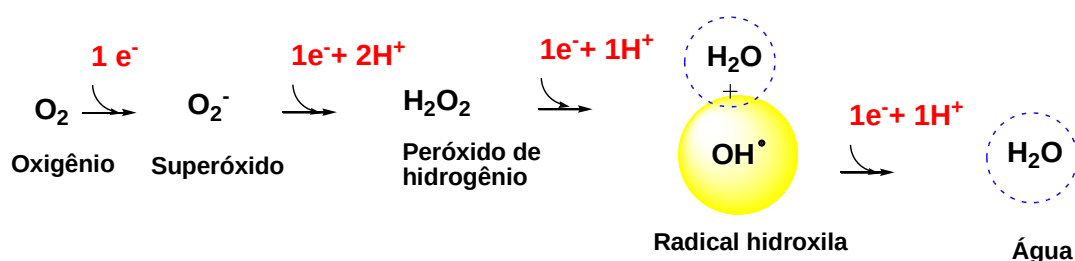
A oxidação no meio biológico leva a formação de radicais livres, sendo esse processo fisiológico, contínuo e de fundamental importância para a vida aeróbia e para o metabolismo ao cumprir funções biológicas relevantes como a produção de ATP (BIRBEN *et al.*, 2012). Em proporções adequadas gera benefícios como produção de energia por meio da cadeia transportadora de elétrons, e participação

de mecanismos de defesa contra infecção (MAIA; SANTOS; REIS, 2014). Porém, quando ocorre alguma disfunção biológica pode acarretar desequilíbrio entre a quantidade gerada e desativada, provocando efeitos nocivos à saúde (BARBOSA *et al.*, 2010, PERSSON *et al.*, 2019).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados. São formados a partir de uma redução incompleta do oxigênio, induzindo a formação de espécies altamente reativas e nocivas para o meio biológico, podendo atacar alvos celulares diversos para serem estabilizados (TESTON; NARDINO; PIVATO, 2010; MARTELLI; NUNES, 2014). Estes radicais recebem duas denominações a depender de onde se encontra o elétron desemparelhado: espécie reativa de nitrogênio (RSN) ou espécie reativa de oxigênio (ROS). São exemplos desde último, os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), o óxido nítrico (NO), o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GOTTLIEB; MORASSUTTI; CRUZ, 2011).

Na respiração, o oxigênio é consumido junto com os substratos metabólicos, enquanto o ATP, água e CO_2 são produzidos. Esse processo que ocorre na etapa final da cadeia respiratória mitocondrial, envolve a redução do oxigênio por 4 elétrons para a formação da água, (Figura 2). Embora o processo oxidativo nas células geralmente resulte na redução quase que simultânea do oxigênio sem a liberação de intermediários, a formação das ROS é inevitável. Vale ressaltar, que o interior de uma célula é um ambiente redutor, e muitos dos componentes celulares são capazes de reagir diretamente com o oxigênio, competindo com as enzimas que controlam e direcionam as reações benéficas do mesmo (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012).

Figura 2 - Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando a formação das espécies reativas do oxigênio: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil.



Fonte: Adaptado de (BUETTNER *et al.*, 1983).

O estresse oxidativo pode ser minimizado pelas modificações das condições ambientais ou pela administração de compostos capazes de bloquear ou minimizar o desencadeamento das reações oxidativas (SOMMER, 2005). Neste respeito, várias estratégias vêm sendo usadas. Entre elas, aumentar os níveis intracelulares de Superóxido Dismutase (SOD) ou administrar SOD de maneira exógena. Entretanto, o uso de SOD como tratamento terapêutico é bastante restrito devido ao custo, autorização para uso e efeitos colaterais (KACHADOURIAN *et al.*, 2003).

É reconhecido que os antioxidantes não enzimáticos presentes na dieta alimentar ou intencionalmente adicionados a ela, são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, tem importante papel na manutenção da saúde. O sistema antioxidante enzimático não é especializado na eliminação do radical hidroxil, e a única maneira de inviabilizar o ataque desse radical a biomoléculas é impedindo sua formação pela administração de antioxidantes exógenos. Neste aspecto, as vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, retinol, carotenóides), ácido úrico e glutathione (GSH) atuam no sequestro desse radical com a formação de produtos menos reativos, impedindo as reações oxidativas em cadeia (SIDDAIAH, 2006). Destacam-se também como antioxidante não exógeno, os minerais, como zinco, cobre, selênio e magnésio, e os compostos fenólicos (BARBOSA, 2010).

Apesar da importância dos compostos fenólicos no estresse oxidativo ser reconhecida, a atividade *in vivo* desses compostos é difícil de ser demonstrada em decorrência da baixa biodisponibilidade e acúmulo na região gastrointestinal (HIGDON, 2003). Isso por sua vez, é em grande parte consequência da sua elevada susceptibilidade para modificações metabólicas. Devido à presença de múltiplas ligações -OH, os polifenóis são substratos prontos para a Fase II do metabolismo das drogas que rapidamente converte-os para os sulfatos, os glucuronídeos e éteres metílicos (HIGDON, 2003).

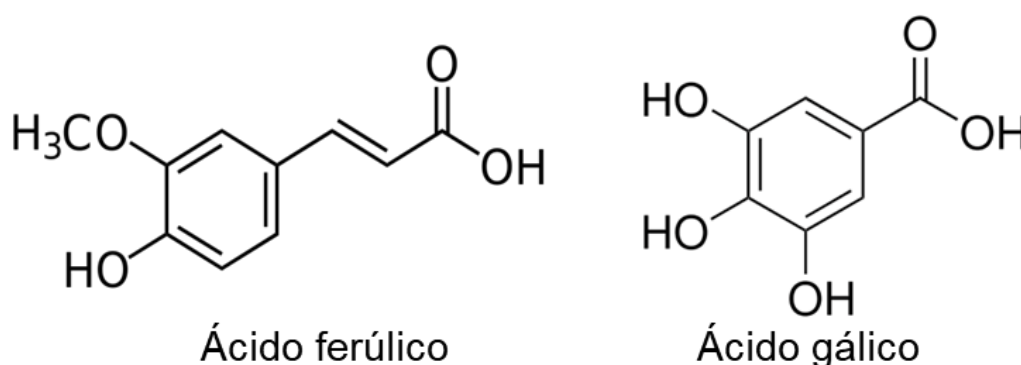
2.2 Ácido ferúlico e ácido gálico

Os compostos fenólicos simples vêm sendo cada vez mais estudados por possuir propriedades antioxidantes com elevada inibição radicalar. Estes compostos contêm em suas estruturas pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxil como grupo funcional. Dentre eles, o ácido ferúlico possui maior capacidade antioxidante e baixa toxicidade, inibe enzimas citostáticas associadas à inflamação e possui

atividade neuroprotetora e fotoprotetora. Foi extraído pela primeira vez em 1866, de várias espécies de plantas, mas é facilmente sintetizado em laboratório a partir da via sintética do ácido chiquímico, partindo-se dos aminoácidos fenilalanina e L-tirosina (SOARES, 2002).

O ácido ferúlico é um composto fenólico hidrofóbico, também denominado ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido hidroxicinâmico) (HUMA *et al.*, 2022) (Figura 3). Tem sido relatado em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, por sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e efeito radioprotetor (DAS *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2019).

Figura 3 - Estrutura química do ácido ferúlico e gálico.



Fonte: Yin *et al.* (2019) e Sigma-Aldrich (2024)

A capacidade antioxidante deste composto deve-se a três fatores (PAIVA; GOLDBECK; SANTOS; SQUINA, 2013, MANCUSO; SANTANGELO, 2014):

- 1) O anel benzênico conter presença de grupos doadores de pares de elétrons;
- 2) A presença de uma instauração na cadeia lateral, a qual promove sítios de ataques aos radicais livres, o que evita lesões à membrana celular;
- 3) Presença do grupamento carboxílico (a,b-insaturado) que contribui na estabilização do radical intermediário ou fornece local de ataque adicional para os radicais livres.

O mecanismo de ação antioxidante do ácido ferúlico é relacionado a inibição da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e neutralização de radicais livres. Além disso, esse ácido é responsável por quelar íons metálicos protonados (ZDUŃSKA *et al.*, 2018) e apresenta atividade de eliminação de radicais livres de forma indireta. O efeito indireto ocorre devido à sua capacidade de regular de forma positiva o sistema hemeoxigenase-biliverdina redutase, que é responsável

por gerar bilirrubina, um eliminador endógeno de radicais livres (PAIVA; GOLDBECK; SANTOS; SQUINA, 2013).

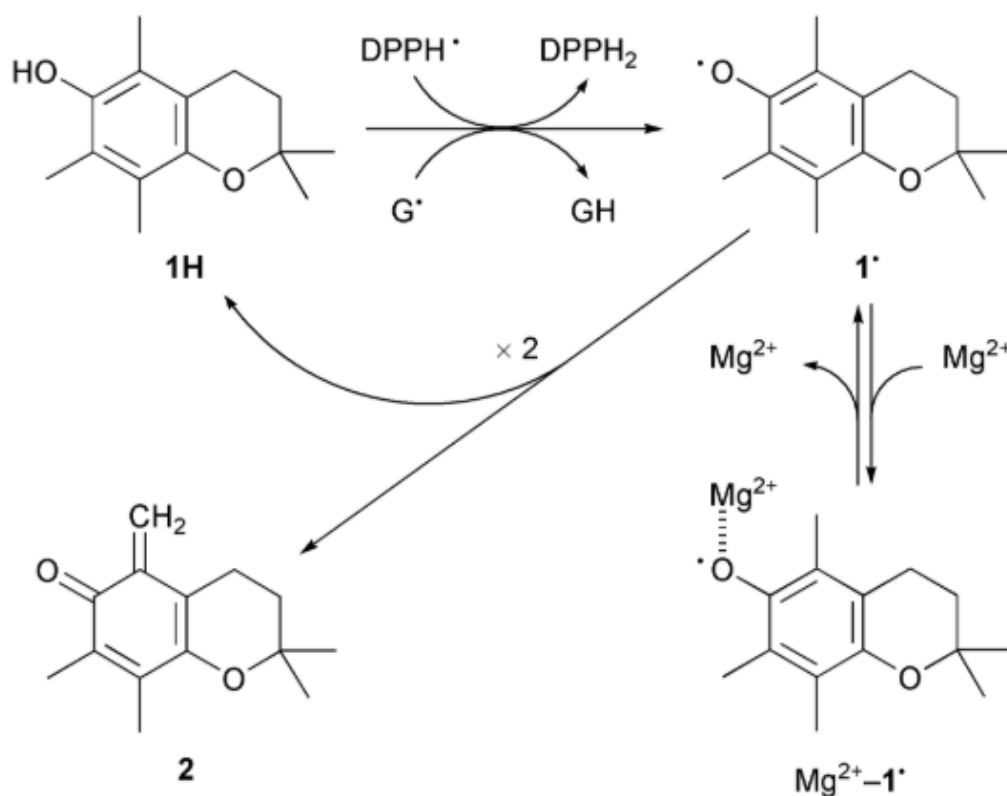
O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) é um composto fenólico derivado do metabolismo secundário das plantas através da via do ácido chiquímico. O ácido gálico é uma molécula plana, constituída por um anel aromático, três grupos hidroxila fenólicos e um grupo ácido carboxílico (Figura 3). Os três grupos hidroxila estão ligados ao anel aromático em uma posição orto em relação um ao outro. É esta ordem de arranjo o principal determinante da forte capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (BADHANI *et al.*, 2015). Esta molécula antioxidante tem potencial para muitas atividades protetoras, incluindo atividades antiapoptóticas, antimicrobianas e anticancerígena e neuroprotetora (DAGLIA *et al.*, 2014).

2.3 Magnésio

O Magnésio (Mg^{2+}) é um metal alcalino-terroso com configuração $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$ e estado de oxidação 2^+ . É um dos íons metálicos mais abundantes na crosta (JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012). O Mg^{2+} apresenta numerosas funções celulares e enzimáticas, incluindo canais iônicos e ciclos metabólicos. Atualmente são conhecidas mais de 300 enzimas nas quais o magnésio atua como cofator inorgânico em reações enzimáticas do Metabolismo. É necessária uma média de 300 a 400 mg/dia de Mg^{2+} para suprir as necessidades fisiológicas dependendo do indivíduo (YANG *et al.*, 2014).

Além disso, por ter função na regulação da passagem de íons, atua na estabilização de membrana neuromuscular, cardiovascular e no tônus vascular (SEVERO *et al.*, 2015). Alguns estudos tem demonstrado que íons metálicos de Mg^{2+} podem estabilizar significativamente radicais livres, minimizando sua reatividade ao formarem complexos intermediários. Um exemplo pode ser observado com o radical fenoxil do análogo de vitamina E (1H) gerado pela transferência de átomos de hidrogênio de (1H) para o DPPH•, sendo significativamente estabilizado pelo Mg^{2+} na forma de complexação, conforme representado na (Figura 4) (NAKANISHI *et al.*, 2002).

Figura 4 - Estabilização de radical fenoxil do análogo de vitamina E, por meio do complexo de Mg^{2+} .



Fonte: Nakanishi *et al.* (2002).

Em estado fisiológico normal, as concentrações de Mg^{2+} mantêm a função neurológica essencial para a condução sináptica. Suas variáveis de concentração podem gerar diversos efeitos nas funções intelectuais e neuronais por meio de mecanismos bioquímico (NOWAK *et al.*, 1984; MAYER, WESTBROOK, GUTHRIE, 1984; VANDENBERG, 1987; MATSUDA, SAIGUSA, IRISAWA, 1987), sendo esses mecanismos críticos para a degradação neuronal crônica e no desenvolvimento de demência (VINK; NECHIFOR, 2011). Estudos demonstraram que a baixa ingestão de Mg^{2+} induziu a perda de neurônios dopaminérgicos em ratos (OYANAGI, 2005) e que a suplementação com Mg^{2+} evitou a perda desses neurônios, indicando o papel do Mg^{2+} como protetor de neurônios na substância negra de degeneração (OYANAGI, 2006; HASHIMOTO *et al.*, 2008).

Dessa forma, por participar dos mecanismos bioquímicos das propriedades neuronais e das funções sinápticas, este composto está diretamente envolvido na fisiologia patológica das doenças neurodegenerativas (VINK; NECHIFOR, 2011). Evidências recentes sugerem que o Mg^{2+} está associado à Doença de Alzheimer (DA), pois estudos verificaram níveis de Mg^{2+} diminuídos em soro e tecidos cerebrais

de pacientes portadores desta doença (DURLACH, 1990; GLICK, 1990; LEMKE, 1995; ANDRÁSI, IGAZ, MOLNÁR, MAKÓ, 2000; VURAL *et al.*, 2010). O déficit de magnésio pode levar a deficiências específicas na memória (BARDGETT *et al.*, 2005; BARDGETT, 2007), enquanto, a terapia de suplementação pode facilitar a recuperação da função cognitiva após uma lesão cerebral (ENOMOTO *et al.*, 2005; HOANE, 2005; HOANE, 2007).

2.4 Complexos de Mg (II)

A química de coordenação, inserida no campo da química supramolecular, tem ganhado cada vez mais destaque devido às características vantajosas dos compostos de coordenação, tais como ocorrência de várias geometrias e números de coordenação, no qual possibilitam a obtenção de supermoléculas através de reações de automontagem e a capacidade espontânea de regeneração de complexos, associada às propriedades redox, catalítica e fotoquímica (ARAKI; TOMA, 2002).

Com fim de aplicabilidade biológica, as pesquisas com estes compostos de coordenação, começaram desde 1900, e atualmente, diante da grande versatilidade dos complexos metálicos, estes ganharam papel essencial nas indústrias farmacêuticas, químicas e agrícolas (KUMAR; DHAR; SHAXENA, 2009).

Os complexos metálicos de magnésio com antioxidantes coordenados, tem ganhado destaque nesta área por formarem complexos estáveis, baixa toxicidade e solúveis no meio aquoso (OLIVEIRA, 2012). Estudos realizados comparando a atividade antioxidante da queratina pura e do complexo queratina-magnésio demonstraram que o complexo apresenta maior atividade antioxidante, que a queratina livre. Isso sugere que os íons metálicos tenham alterado as propriedades químicas da queratina, potencializando sua ação antioxidante, visto que, esses íons desempenham papel vital na estabilização de radicais livres (GHOSH *et al.*, 2015). Os complexos Mg(II) e Mn(II)/Na(I) com ácido isoferúlico apresentaram maior atividade antioxidante do que o ligante sozinho (KALINOWSKA *et al.*, 2021) e complexo de Mg(II) contendo ácido ferúlico e 1,10-fenantrolina como quelantes demonstrou efetividade para eliminar e neutraliza radicais DPPH[•], ABTS⁺, peróxil e oxigênio singlete (MARCHI *et al.*, 2024).

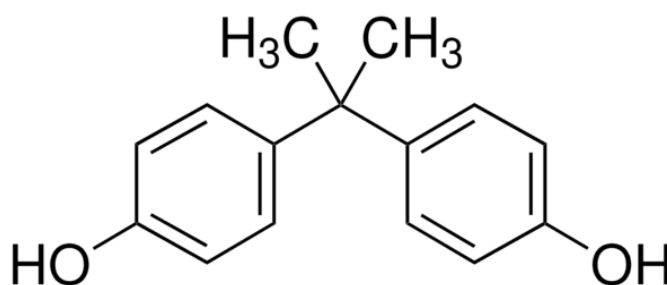
No presente estudo avaliamos os efeitos do complexo Mg-ferúlico na mitigação dos efeitos do fipronil sobre o comportamento de peixes *D. rerio*. Uma das

grandes vantagens em utilizar compostos metálicos de magnésio está no fato deste não atuar como pró-antioxidante, possui baixo custo de síntese, não apresentar toxicidade e aumenta a biodisponibilidade do ferúlico após a coordenação.

2.5 Bisfenol como neuroindutor

O bisfenol é um composto químico sintético, sendo uma das primeiras substâncias a se atrelar ao risco de atividade estrogênica ao interagir com os receptores de estrogênio humano. Tem ganhado atenção de muitos pesquisadores e agências regulamentadoras devido possíveis genotoxicidade, caráter alergênico e estrogênico, além de sua grande produção mundial (TAKAYANAGI *et al.*, 2006).

Figura 5 - Estrutura química do Bisfenol A, composto orgânico sintético usado na produção de diversos tipos de plásticos.



Fonte: Sigma-Aldrich, (2024).

Pertence à família dos produtos químicos conhecidos como desreguladores (disruptores) endócrinos e amplamente utilizados na produção de policarbonatos plásticos e de resina epóxi, tornando-se uma das substâncias de maior volume produzido em todo o mundo. Seu caráter de toxicidade reprodutiva é bem reconhecido e, além disso, gera outros efeitos tóxicos por diversas vias, com destaque à indução de estresse oxidativo, desregulando o nível de radicais livres no organismo e consequentemente causando danos aos órgãos vitais (FAHEEM; LONE, 2018).

As propriedades estrogênicas do bisfenol estão relacionadas à sua capacidade de agir no sistema endócrino, como também de interferir no sistema imunológico e nervoso. O bisfenol tem associação com diversos distúrbios neuropsicológicos e neurocomportamentais justificados pela sua característica

lipofílica e sua capacidade de atravessar barreiras hematoencefálicas. Um estudo realizado em roedores demonstrou que a exposição do bisfenol ao sistema reprodutor contribuiu para o desenvolvimento de transtornos neurocomportamentais em descendentes dos ratos (KARLSGODT *et al.*, 2008)

Estudos realizados por Mu e Gage (2011), comprovaram a ação citotóxica do bisfenol em macrófagos. Verificou-se a capacidade de indução de diversos processos intracelular, além da geração de ROS. Os resultados apontaram que o efeito tóxico do bisfenol atuava sobre a via oxidativa e apoptótica mitocondrial ligada ao estresse em macrófagos (MU *et al.*, 2018).

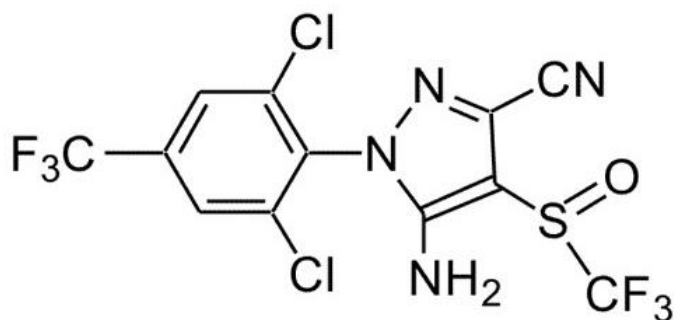
Utilizando o Zebrafish como modelo animal, pesquisas demonstraram que para 50% dos embriões expostos ao bisfenol em uma dose de 5,25 mg/L não houve eclosão. O que ressalta a associação entre este composto e disfunções endócrinas e reprodutivas (CHAN; CHAN, 2012). Em outro estudo, também em embriões de Zebrafish, foram relatados distúrbios no desenvolvimento cerebral em diferentes estágios e ainda o aumento da ocorrência de doenças neurodegenerativas (FONSECA, 2018).

2.6 Fipronil como neuroindutor

O fipronil (FIP) é um inseticida sistêmico que atua no sistema inibidor do sistema nervoso. Liga-se aos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA) e aos receptores de glutamato acoplados aos canais de cloreto, bloqueando os receptores que atuam como inibidores, levando à excitação do sistema nervoso e à hiperexcitação neuronal devido ao acúmulo do neurotransmissor GABA nas junções sinápticas. O estresse oxidativo induzido pelo Fipronil pode causar peroxidação lipídica, que é o dano oxidativo às membranas celulares. Este processo resulta na perda da integridade da membrana celular e pode levar à morte celular (SIMON-DELISO *et al.*, 2015). Como os receptores de glutamato são específicos dos insetos, o fipronil possui toxicidade seletiva para invertebrados em vez de mamíferos (WANG *et al.*, 2016). No entanto, o fipronil pode causar uma variedade de efeitos tóxicos em vertebrados não-alvo (WANG *et al.*, 2016).

As características de solubilidade, o potencial de lixiviação e a persistência da do fipronil representam um risco contínuo e crescente para ambientes aquosos. Com uma escala de utilização cada vez maior sua detecção em águas subterrâneas e superficiais tem sido observada em todo o mundo (BONMATIN *et al.*, 2015).

Figura 6 - Estrutura química do Fipronil, inseticida de amplo espectro utilizado no controle de pragas, tendo como núcleo Central um anel pirazol de cinco membros, com dois átomos de nitrogênio.



Fonte: Sigma-Aldrich, (2024).

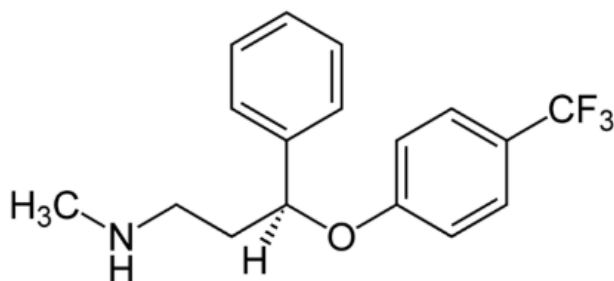
O fipronil pode causar produção de espécies reativas de oxigênio nas células, o que leva ao aumento dos níveis de peroxidação lipídica e ao estresse oxidativo (KI *et al.*, 2012). O estresse oxidativo induzido pelo fipronil alterar o sistema de defesa antioxidante e levar a danos às macromoléculas celulares, como lipídios, DNA e proteínas. A morte celular ocorre por mecanismos apoptóticos ou necróticos após estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo induzido pelo fipronil pode ocasionar inflamação e apoptose em tecidos do Zebrafish (WU *et al.*, 2021). A exposição de peixes-zebra causou alterações significativas nas atividades da glutathione-S-transferase no cérebro, fígado, músculo, quando o Zebrafish foi tratado com fipronil nas concentrações de 2, 4 e 20 µg/L por 24 h (MARGARIDO *et al.*, 2013). Para essas mesmas concentrações também foi observado aumento da atividade da 7-etoxicumarina O-desetilase (ECOD) no cérebro, brânquias, fígado e tecidos musculares de maneira dependente da dose (WU *et al.*, 2014).

2.7 Fluoxetina e Imipramina

A fluoxetina (FLX), cujo nome IUPAC é N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina possui fórmula molecular $C_{17}H_{18}F_3NO$ (Figura 7) e peso molecular de 309,3 g/mol, a fluoxetina geralmente é encontrada na forma de cloridrato de fluoxetina, que é um pó cristalino branco a esbranquiçado. O cloridrato de fluoxetina é solúvel em água, com uma solubilidade que varia dependendo do pH. É também solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e clorofórmio. (WENTHUR *et al.*, 2014).

Figura 7 - Estrutura química da fluoxetina, antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina.



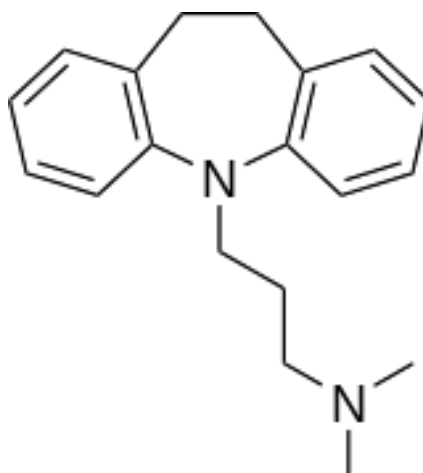
Fonte: Lima *et al.*, (2014).

A fluoxetina é um antidepressivo que atua na inibição da recaptação seletiva de serotonina, assim aumentando a quantidade de serotonina na fenda sináptica (FONTANA *et al.*, 2018). A serotonina é um neurotransmissor presente nos mamíferos, mas também encontrada em peixes e de grande importância para o reino animal, pois é responsável na regulação do estresse, modulando comportamento de interação social, agressividade, alimentação e ansiedade (FERREIRA, 2020). A fluoxetina aumenta os níveis de serotonina no cérebro do Zebrafish, devido à inibição da recaptação desse neurotransmissor. Esse aumento na disponibilidade de serotonina está correlacionado com os efeitos ansiolíticos e antidepressivos observados (FONTANA *et al.*, 2018, CORREIA *et al.*, 2022).

Em Zebrafish, a fluoxetina reduz comportamentos de ansiedade e depressão, aumenta a atividade locomotora em doses terapêuticas, e promove neurogênese. Ela também eleva os níveis de serotonina no cérebro e altera a expressão de genes relacionados à neurotransmissão e neuroplasticidade (CORREIA *et al.*, 2022). A administração aguda de fluoxetina não modificou o comportamento do Zebrafish de evitar o ambiente claro, ao contrário do tratamento crônico que aumentou o tempo despendido no compartimento claro na maior dose, sugerindo efeito ansiolítico do fármaco (MAXIMINO *et al.*, 2011).

A imipramina, cujo nome IUPAC é 3-(10,11-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)-*N,N*-dimetilpropano-1-amina possui fórmula molecular C₁₉H₂₄N₂ (Figura 8) e peso molecular de 280.41 g mol⁻¹.

Figura 8 - Estrutura química da imipramina, antidepressivo tricíclico, constituída pelo sistema de três anéis condensados, dois anéis benzeno fundidos a um anel central com um átomo de nitrogênio (dibenzoazepina).



Fonte: adaptado de Sabin; Ferrão; Furtado, (2004).

A imipramina é um antidepressivo tricíclico amplamente utilizado no tratamento de transtornos depressivos que age inibindo a recaptação de noradrenalina (NA) e bloqueando o transporte de serotonina (5-HT) aumentando a concentração de tais aminas na fenda sináptica (NASCIMENTO, 2014). Além disso, age como antagonistas competitivos dos receptores colinérgicos, histamínicos H1 e adrenérgicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$. A imipramina, quando testada em Zebrafish reduz comportamentos de ansiedade e depressão, aumenta a atividade motora em doses adequadas e melhora a resposta ao estresse, tornando os peixes menos estressados (MAXIMINO *et al.*, 2014).

A imipramina pode aumentar a atividade motora dos Zebrafish em doses adequadas, mas doses altas podem causar hiperatividade ou sedação (MAXIMINO *et al.*, 2014). O medicamento também altera os níveis de neurotransmissores como serotonina e norepinefrina no cérebro dos Zebrafish e pode afetar a produção de hormônios do estresse, como o cortisol. A regulação do cortisol é um indicador importante da resposta ao estresse e dos efeitos ansiolíticos do medicamento (ALSOP e VIJAYAN, 2008).

2.8 Comportamento do *Danio rerio*

Comportamentos associados ao medo são reações naturais de adaptação. O Zebrafish responde a um estímulo liberando uma substância de alarme pelas células epidérmicas após lesões físicas na pele, e isso induz respostas comportamentais específicas da espécie, incluindo movimentos erráticos bem como o aperto do cardume (GERLAI; FERNANDES; PEREIRA, 2009).

O teste de preferência claro/escuro reflete o conflito do Zebrafish entre permanecer em locais “seguros” – neste caso, o ambiente escuro, porque a distribuição dorsal dos melanóforos no peixe tende a minimizar a refração e reflexão da luz, reduzindo assim a visualização dos predadores – versus uma motivação inata para explorar novos ambientes. Em geral, o Zebrafish adulto mostra uma preferência significativa pelo compartimento escuro e evita a luz (MAXIMINO *et al.*, 2010). O tempo no ambiente escuro indica o comportamento ansioso propriamente dito, a primeira latência é uma medida de impulsividade para explorar novos ambientes e o número de cruzamentos é uma medida da atividade motora (MAGNO *et al.*, 2015).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para avaliar a agressividade do peixe, uma delas é o teste do espelho. Nesse teste a imagem do próprio animal é refletida no espelho, como os peixes não reconhecem a própria imagem no espelho interpretam como sendo um predador, atacando-o. A aparência agressiva do animal é definida com a postura de suas nadadeiras com pequenos movimentos ondulatórios e batidas com a nadadeira caudal, e também é marcado por nados rápidos e tentativas de morder o espelho como uma forma de agressão (GERLAI, LAHAV, GUO, ROSENTHAL, 2000).

O Zebrafish vive preferencialmente em cardume com até 50 peixes (MUTO, KAWAKAMI, 2013). Em laboratório, estes comportamentos podem ser estudados através de protocolos experimentais que quantificam essa tendência específica, quando estes têm de escolher entre um compartimento com um cardume ou um compartimento vazio. A maior permanência no quadrante do lado do aquário com 15 peixes indica interação social, já a permanência no quadrante do aquário vazio indica menor interação (GERLAI, LAHAV, GUO, ROSENTHAL, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar através da avaliação comportamental a eficiência do complexo metálico Mg-ferúlico como inibidor do estresse oxidativo no peixe Zebrafish após indução pelos indutores bisfenol e Fipronil.

3.2 Específicos

- a) Avaliar a perda de reflexo de postura e paralisia do Zebrafish quando exposto aos neuroindutores bisfenol e fipronil;
- b) Verificar o comportamento de medo e ansiedade no teste de exposição ao predador;
- c) Observar a agressividade no teste do espelho;
- d) Analisar o comportamento de ansiedade, medida de impulsividade e atividade motora no teste de claro-escuro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação dos peixes e tratamentos

Foram utilizados animais de 10 a 12 meses de idade (3,5 – 4,0 cm de comprimento), na proporção de 50:50 (machos:fêmeas). Os peixes foram provenientes do Biotério do Centro Universitário Guanambi. Os animais foram aclimatados em aquários retangulares de 25,0 L com temperatura de $28 \pm 0,5$ °C e com um ciclo claro/escuro de 14h/10h (Das 8:00 às 22h) por meio de controle automático de iluminação com timer, pH 7,0 e oxigênio dissolvido 7,5 mg O₂/L, que foram monitorados diariamente, e concentração de amônia (ideal = 0) que foi monitorada uma vez por semana (GHOSH *et al.*, 2015). Os peixes foram alimentados durante todo experimento com ração (JBL NOVO BITS) 2 vezes ao dia e com artêmia salina 2 vezes por semana. Todos os experimentos foram realizados na sala de experimentação animal do Centro Universitário Guanambi e os procedimentos deste projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIFG) do Centro Universitário Guanambi e aprovado por meio do protocolo 01/2023.2.

O estudo foi conduzido com oito tratamentos com grupos de 10 peixes tratados da seguinte maneira:

Figura 9 - Fluxograma do delineamento experimental.

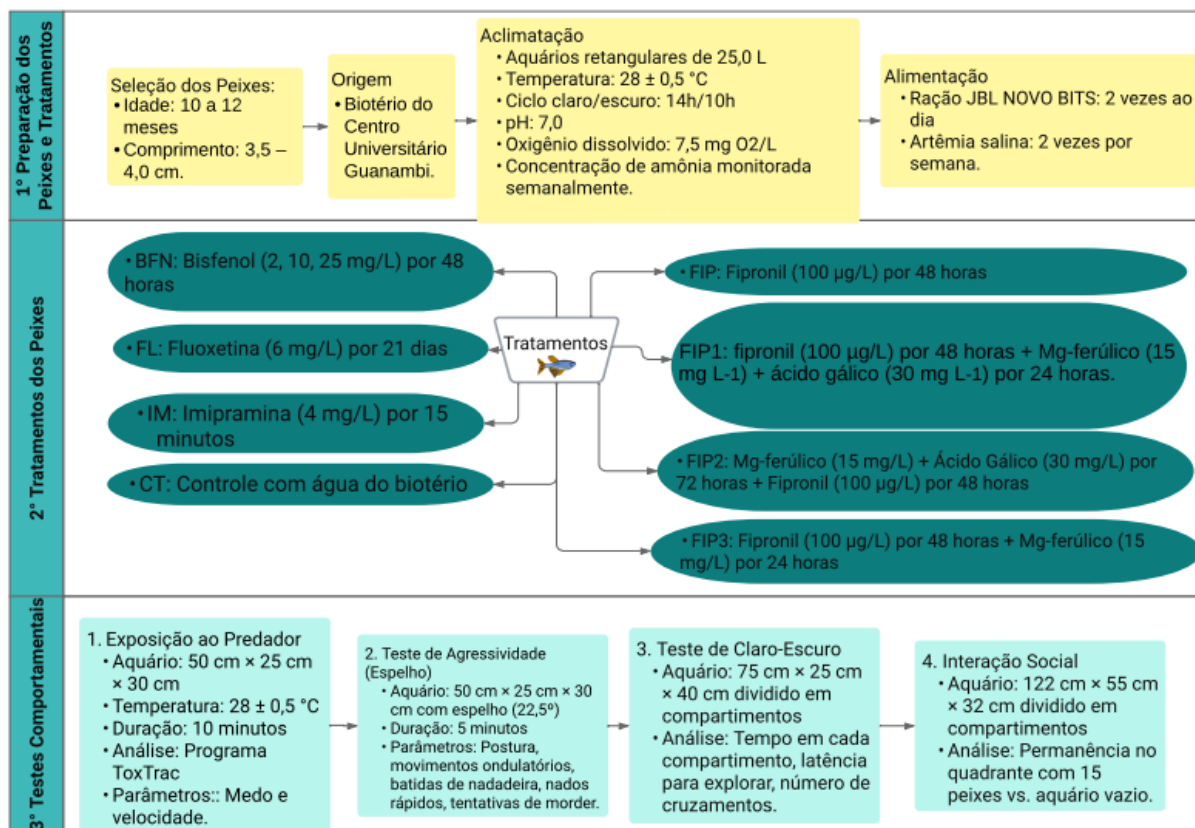


Tabela 1 - Descrição dos tratamentos

Tratamentos	Descrição
BPA	Peixes tratados com bisfenol (2, 10 e 25 mg/L) por 48 horas.
CT	Peixes controle mantidos em água do biotério.
FL	Peixes tratados com fluoxetina (6 mg/L) por 21 dias.
IM	Peixes tratados imipramina (4 mg/L) por 15 minutos.
FIP	Peixes tratados com fipronil (100 µg/L) durante 48 horas.
FIP1	Peixes tratados com fipronil (100 µg/L) durante 48 horas e posteriormente com solução de Mg-ferúlico (15 mg/L) + ácido gálico (30 mg/L) durante 24 horas.
FIP2	Peixes tratados com solução de Mg-ferúlico (15 mg/L) + ácido gálico (30 mg/L) durante 72 horas e posteriormente submetidos a aplicação de fipronil (100 µg/L) por 48 horas.
FIP3	Peixes tratados com fipronil (100 µg/L) durante 48 horas e posteriormente com solução de Mg-ferúlico (15 mg/L) durante 24 horas.

A imersão em água é um método efetivo de administração de medicamentos em peixes-zebra (MAGNO *et al.*, 2015). Portanto a administração das drogas foi realizada por imersão em um béquer de 200 mL por tempos específicos, todas as soluções foram preparadas com água do biotério.

Os experimentos foram realizados durante períodos de 72, 96 e 144 horas, e prolongada até 21 dias no tratamento com fluoxetina (FL) (KIKUZAKI *et al.*, 2002). No tratamento com FL, os peixes foram submetidos à dosagem de 6 mg/L (FERREIRA, 2020), em constante oxigenação, diariamente, durante uma hora a partir das 8:30 horas durante 21 dias. A solução foi reposta todos os dias. Os peixes também foram expostos à fluoxetina por uma hora antes do teste de tanque novo no 22º dia, no qual ocorreu os testes comportamentais. Um grupo de peixes também foi exposto a imipramina (6 mg/L) por 15 minutos e posteriormente avaliados em testes comportamentais. No entanto, como o estudo avaliou efeitos crônicos dos compostos, apenas os resultados da aplicação de fluoxetina foram utilizados para comparação com os demais tratamentos.

No tratamento BPA um grupo de 10 peixes foram submetidos a imersão em um béquer de 200 mL com a solução de bisfenol (2, 10 e 25 mg/L) durante 48 horas em constante oxigenação. Após este período, os animais foram colocados em um aquário com água do biotério sem nenhuma solução por 24 horas, e assim realizado os testes comportamentais.

No tratamento com o FIP um grupo de 10 peixes foram submetidos a imersão em um béquer de 200 mL com a solução de fipronil 100 µg/L durante 48 horas em constante oxigenação. Após este período os animais foram colocados em um aquário com água do biotério sem nenhuma solução por 24 horas, e assim realizado os testes comportamentais.

Nos tratamentos FIP1, 2 e 3 o efeito protetivo do Mg-ferúlico foi investigado. No tratamento FIP1, um grupo de 10 peixes foi submetido a imersão em um béquer de 200 mL com a solução de fipronil 100 µg/L durante 48 horas em constante oxigenação. Após este período os animais foram expostos a solução de Mg-ferúlico (15 mg/L) + ácido gálico (30 mg/L) durante 24 horas, em seguida mantidos em um aquário com água do biotério por 24 horas e assim realizados os testes comportamentais.

No experimento FIP2, o efeito protetivo do Mg-ferúlico foi investigado por meio da imersão de 10 peixes em um béquer de 200 mL, com solução de Mg-ferúlico (15 mg/L) + ácido gálico (30 mg/L) durante 72 horas e posteriormente

submetidos a aplicação de fipronil (100 µg/L) por 48 horas, em seguida mantidos em um aquário com água do biotério por 24 horas e assim realizados os testes comportamentais.

No tratamento FIP3, 10 peixes foram submetidos a imersão em um béquer de 200 mL com a solução de fipronil 100 µg/L durante 48 horas em constante oxigenação. Após este período os animais foram expostos a solução de Mg-ferúlico (15 mg/L durante 24 horas, em seguida mantidos em um aquário com água do biotério por 24 horas, seguido de realização dos testes comportamentais.

Após imediata realização dos experimentos comportamentais todos os peixes foram expostos ao anestésico Benzocaina (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate) via imersão até cessar os movimentos operculares e posteriormente congelados para realização de estudos enzimáticos.

A concentração de fluoxetina (6 mg/L) utilizada no estudo foi baseada em estudos de Magno *et al.* (2015). Para o fipronil foi utilizada uma concentração considerada subletal (100 µg/L), capaz de causar os efeitos de estresse oxidativo esperados sem causar morte dos animais. A determinação da concentração a ser utilizada foi baseada em estudos anteriores (WU *et al.*, 2014, 2021) e testada previamente em laboratório.

O complexo metálico Mg-ferúlico foi sintetizado e caracterizado no Laboratório de Fotoquímica e Bioinorgânica da Universidade Federal de São Carlos LaFIB-Ufscar. Foram realizados testes de dosagem em um modelo animal para avaliar a eficácia da droga em diferentes concentrações. Devido à limitação na quantidade da droga sintetizada, a dosagem máxima foi 15 mg/L, com o objetivo de maximizar a probabilidade de observar efeitos terapêuticos.

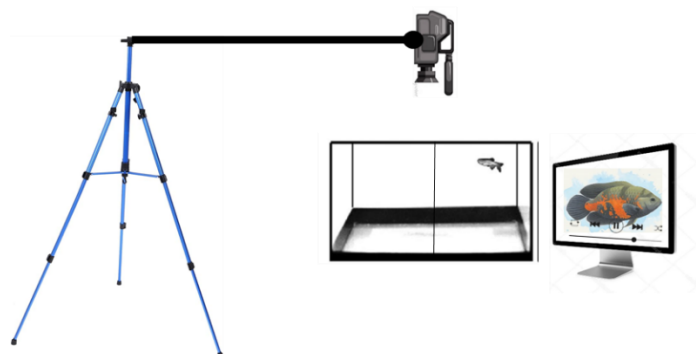
4.2 Análise comportamental

4.2.1 Exposição ao predador

No teste de exposição ao predador, o Zebrafish foi colocado individualmente em um aquário de dimensões (50 cm × 25 cm × 30 cm, comprimento × largura × altura) com uma coluna de água de 15 cm com uma temperatura a $28 \pm 0,5$ °C, em contato visual com uma imagem animada (em movimento) do predador ocasionando respostas comportamentais, que foram monitoradas por vídeos por 10 minutos e analisados pelo programa ToxTrac (Figura 10). Posteriormente foi avaliada a posição do peixe em seu aquário, distância em relação ao seu predador e a

atividade natatória, respostas consideradas indicativas em relação ao medo (GERLAI, FERNANDES, PEREIRA, 2009). Após cada experimento 50% da água foi renovada.

Figura 10 - Teste de exposição ao predador.

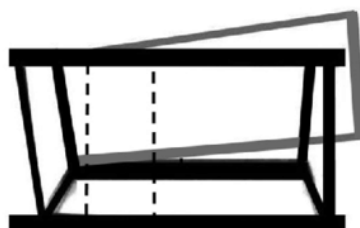


Fonte: autor , 2024.

4.2.2 Agressividade (teste do espelho)

No teste de agressividade os peixes foram avaliados individualmente em aquário com as dimensões (50 cm × 25 cm × 30 cm, comprimento × largura × altura) e um espelho colocado ao fundo com um ângulo de 22,5° (Figura 11). A imagem do próprio animal foi refletida no espelho, e o seu posicionamento e postura em relação à imagem foram avaliados como parâmetros de agressividade durante 5 minutos (GERLAI, LAHAV, GUO, ROSENTHAL, 2000). A aparência agressiva do animal foi avaliada quanto à postura de suas nadadeiras com pequenos movimentos ondulatórios, batidas com a nadadeira caudal, nados rápidos e tentativas de morder o espelho como uma forma de agressão. O término da agressão foi determinado quando os animais pararam de investir contra a imagem do adversário (GERLAI, LAHAV, GUO, ROSENTHAL, 2000).

Figura 11 - Ilustração do modelo esquemático do aparato comportamental utilizado no teste de agressividade induzida por espelho.



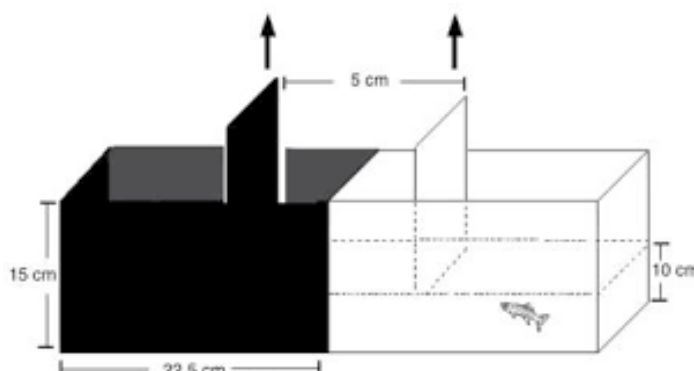
Fonte: Siebel *et al.*, (2015).

4.2.3 Teste de claro-escuro

O teste de claro-escuro foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Stewart *et al.* (2011) e Riehl *et al.* (2011), com algumas modificações. O aparato experimental consistiu em um aquário com as seguintes dimensões (75 cm × 25 cm × 40 cm, comprimento × largura × altura), dividido igualmente em três compartimentos de 25 cm, um branco (claro) e outro com uma plotagem escura de 15% e outro com uma plotagem preta de 100% (escuro), com uma área central (5 cm) delimitada por portas corrediças dando acesso aos compartimentos claro e escuro (Figura 12). O peixe é deixado no compartimento de 15% escuro para explorar todo o aparato por 5 minutos.

Foram analisados os seguintes parâmetros: o tempo em que o animal permaneceu em cada compartimento, latência para explorar o lado oposto à primeira escolha e o número de alternâncias ou cruzamentos.

Figura 12 - Esquema do aquário de acrílico fosco, com a metade clara e outra escura, com portas deslizáveis no centro.



Fonte: adaptado de Chaves *et al.*, (2018).

4.2.4 Interação social

A interação social foi avaliada em um aquário com as seguintes dimensões (122 cm × 55 cm × 32 cm, comprimento × largura × altura), dividido igualmente em três compartimentos de dois 21 cm e um de 80 cm (Figura 13) (STEWART *et al.*, 2014). No aquário central foi adicionado o peixe em estudo, de um lado foi colocado 15 peixes e do outro lado o aquário ficará vazio. A maior permanência no quadrante do lado do aquário com 15 peixes indica interação social, já a permanência no quadrante do aquário vazio indica menor interação (GERLAI *et al.*, 2000).

Figura 13. Teste de interação social.



Fonte: adaptado de Siebel *et al.*, (2015).

4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via e as médias comparadas teste pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls). O nível de significância foi estabelecido para 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos tratamentos com bisfenol, com exposição dos peixes a 2, 10 e 25 mg/L, não foram observadas diferenças significativas de comportamento quando comparados ao grupo controle. Isso pode estar relacionado especialmente ao tempo que o bisfenol A (BPA) leva para se bioacumular em peixes, o qual depende de vários fatores, incluindo a concentração de BPA no ambiente, a espécie de peixe, a dieta dos peixes e as condições ambientais (LIU *et al.*, 2023).

Em geral, o processo de bioacumulação pode ocorrer ao longo de dias, semanas ou até meses (ESER *et al.*, 2022) e baixas concentrações podem ser biodegradadas ou metabolizadas pelos peixes (CANESI e FABBRI, 2015). Por esse motivo, optamos pelo o uso do inseticida fipronil como agente indutor, pois esse composto resultou em alterações comportamentais significativas e duradouras nos peixes (WU *et al.*, 2021).

No estudo com utilização do fipronil houve efeito significativo dos tratamentos para latência, número de cruzamentos, número de episódios de agressividade, tempo de episódios de agressividade, interação social e velocidade média (Tabela 2). Não houve efeito significativo para o tempo do lado escuro, tempo de proximidade ao predador (Tabela 2, Figura 12A, Figura 16B).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para as características tempo do lado escuro (TLE), latência (LAT), número de cruzamentos (NC), número de episódios de agressividade (NEA), tempo de episódios de agressividade (TEA), interação social (IS), velocidade média (VM) e tempo de proximidade ao predador (TPP) em função de diferentes tratamentos (TRAT) em estudo com fipronil.

Fonte de variação	Quadrado médio								
	GL	TLE	LAT	NC	NEA	TEA	IS	VM	TPP
TRAT	5	73691,6 ^{ns}	7623,4 ^{**}	32 ^{**}	39,1 ^{**}	8416,7 ^{**}	164183,1 ^{**}	3399,4 [*]	13961,6 ^{ns}
Erro	48	44791,41	2185,14	2,51	5,57	1392,77	15353,25	814,17	9590,82
CV (%)		93,61	141,65	83,1	63,75	79,88	41,60	47,32	37,63

GL: graus de liberdade, ^{ns} não significativo, ^{*}significativo ($p < 0,05$) ^{**} ($p < 0,01$), de acordo com teste F.

Coeficiente de variação (CV), tempo do lado escuro (TLE), latência (LAT), número de cruzamentos (NC), número de episódios de agressividade (NEA), tempo de episódios de agressividade (TEA), interação social (IS), velocidade média (VM) e tempo de proximidade ao predador (TPP) em função de diferentes tratamentos (TRAT) em estudo com fipronil.

O Zebrafish adulto tende a passar mais tempo na área escura, que representa um ambiente mais seguro, pois distribuição dorsal dos melanóforos no peixe tende a minimizar a refração e reflexão da luz, reduzindo assim a visualização por predadores (ROBEA *et al.*, 2023). Neste estudo o tempo do lado escuro não diferiu entre os peixes controle e dos tratamentos com aplicação de fluoxetina, fipronil e fipronil + Mg-ferúlico (Figura 14A). Verificar o tamanho do próximo parágrafo

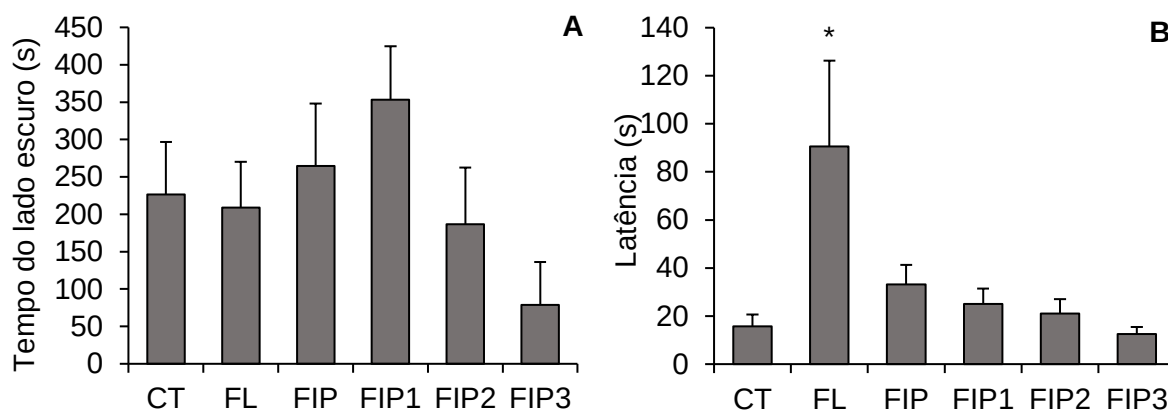
No entanto, a exposição ao fipronil altera o comportamento de preferência natural pelo ambiente escuro do peixe. O comportamento de evitar o escuro, é indicativo de ansiedade, podendo ser explicado pelo bloqueio da sinalização do neurotransmissor GABA mediado por fipronil (EADIE *et al.*, 2020). Larvas de *Danio rerio* expostas a concentração de fipronil de 200 µg/L apresentaram menor número de visitas à zona escura e passaram menos tempo na zona escura em comparação com os controles (EADIE *et al.*, 2020). Estudos realizados com *Danio rerio* adultos expostos a concentração de fipronil de 20 µg/L também não demonstraram preferência natural pelo ambiente escuro (CUENCA *et al.*, 2022).

A latência foi maior em peixes com aplicação de fluoxetina do que os do tratamento controle (Figura 14B). A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS), utilizado para o tratamento crônico de distúrbios psicológicos como depressão e ansiedade (WENTHUR *et al.*, 2014).

Embriões de Zebrafish expostos 2,9 nM de fluoxetina apresentam redução na resposta ao estresse evidenciada pela menor locomoção (ZINDLER *et al.*, 2020). Em peixes adultos a fluoxetina (4 mg/L) aumentou o tempo de permanência no escuro e o tempo da primeira latência e diminuíram o número de cruzamentos ente

as zonas claro/escuro, indicando um efeito de comportamento tipo ansiogênico que resulta em menor locomoção (MAGNO *et al.*, 2015).

Figura 14 - Tempo do lado escuro (A) e latência (B) de peixes *Danio rerio* em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 µg/L) (FIP), fipronil (100 µg/L) e posteriormente Mg-ferúlico + ácido gálico (FIP1), Mg-ferúlico + ácido gálico e posteriormente fipronil (FIP2), fipronil e posteriormente Mg-ferúlico (FIP3). * Médias diferem do controle (CT) de acordo com teste *t* ($p < 0,05$).



Para os tratamentos com fluoxetina, fipronil e fipronil + Mg ferúlico e ácido gálico foi possível verificar uma redução no número de cruzamentos comparado ao controle (Figura 15A). A redução no número de cruzamentos ou alternância entre lado claro e escuro nos tratamentos com aplicação de fipronil evidencia seu efeito negativo na atividade motora dos peixes. O que pode ser relacionado pelo bloqueio da sinalização GABAérgica mediado por fipronil no sistema nervoso central (EADIE *et al.*, 2020) ou diminuição na concentração de neurotransmissores excitatórios em relação aos inibitórios (WANG *et al.*, 2016).

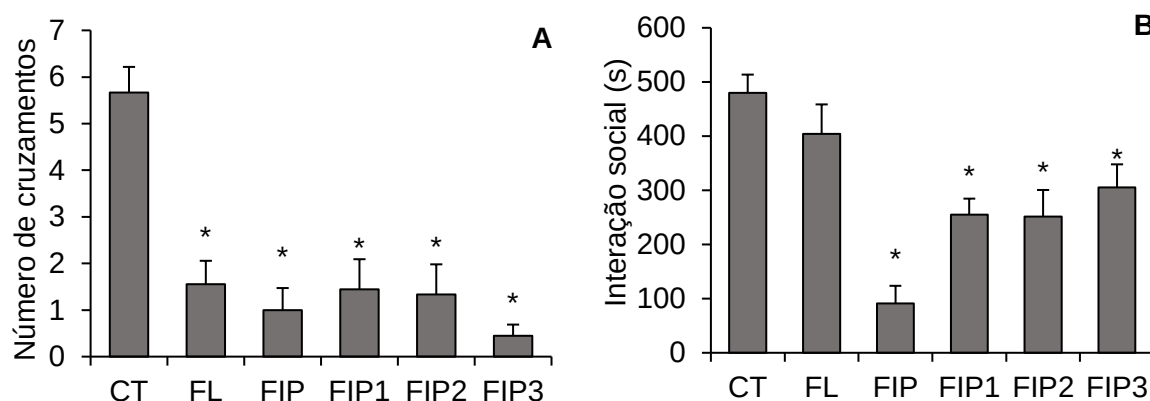
A exposição de peixes-zebra adultos à mistura de fipronil (150 µg/L), piraclostrobina (15 µg/L) e metiltiofanato (135 µg/L) também resultou na redução no número de cruzamentos entre as diferentes zonas do aquário (BEVILAQUA *et al.*, 2020). Por outro lado, a exposição a baixas doses de fipronil (9 e 18 µg/L) podem resultar em maior número de cruzamentos (CHAULET *et al.*, 2019).

A taxa de sobrevivência do Zebrafish no ambiente depende do vínculo social na formação do cardume. Em condições normais, os indivíduos são atraídos por estímulos sociais provenientes de indivíduos do mesmo grupo, formando um cardume (ROBEA *et al.*, 2020). No entanto, o estresse oxidativo e a alteração no sistema serotoninérgico levam a alterações no comportamento social do Zebrafish (ATTARAN *et al.*, 2020). Neste estudo, a interação social dos peixes foi menor em

todos os tratamentos com aplicação de fipronil, associado ou não aplicação do composto metálico antioxidante Mg-ferúlico e ácido gálico livre, ou apenas Mg-ferúlico (Figura 15B). No entanto nos tratamentos com aplicação de Mg ferúlico (FIP1, 2 e 3) a interação social foi 197% maior que no tratamento com fipronil (FIP), o que possivelmente está relacionado à atividade antioxidante deste composto. Em peixes-zebra juvenis expostos à mistura dos inseticidas fipronil e piriproxifeno (600 µg/L) o tratamento com vitamina C atenuou seu efeito negativo sobre o comportamento social dos peixes devido a sua atividade antioxidante que reduziu o estresse oxidativo nos peixes (ROBEA *et al.*, 2020). Um efeito similar pode ser relacionado à aplicação do Mg-ferúlico, este composto possui um átomo de magnésio e fenólico simples o que confere elevada capacidade antioxidante e mitigação dos efeitos do fipronil.

Peixes expostos à fluoxetina apresentaram menor número de cruzamentos comparado ao controle e a interação social não diferiu em relação a peixes controle. Corroborando com esses resultados, a exposição de peixes a 10 µg/L de fluoxetina não influenciou o comportamento exploratório e social. Porém, foram observadas diminuição da atividade locomotora dos peixes (CORREIA *et al.*, 2022), o que se deve aos efeitos da fluoxetina na recaptção da serotonina, que por sua vez tem a capacidade de modular vários comportamentos, como o de locomoção (FERREIRA, 2020).

Figura 15 - Número de cruzamentos (A) e interação social (B) de peixes *Danio rerio* em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 µg/L) (FIP), fipronil (100 µg/L) e posteriormente Mg-ferúlico + ácido gálico (FIP1), Mg-ferúlico + ácido gálico e posteriormente fipronil (FIP2), fipronil e posteriormente Mg-ferúlico (FIP3). * Médias diferem do controle (CT) de acordo com teste *t* ($p < 0,05$).



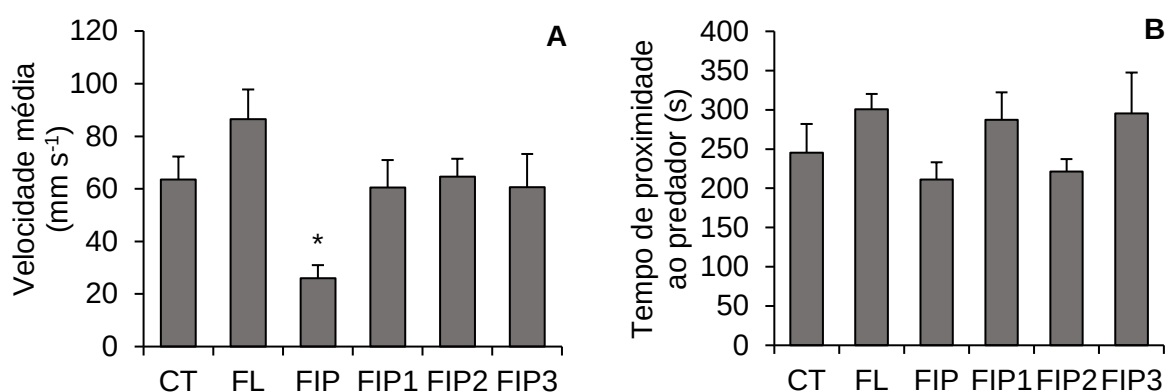
A velocidade média dos peixes é menor com aplicação de fipronil (FIP) e a aplicação de Mg-ferúlico antes ou após a exposição mitiga seus efeitos, com

resultados similares ao controle nos tratamentos FIP1, 2 e 3 (Figura 16A). Nos tratamentos com aplicação de Mg-ferúlico (FIP1, 2 e 3) a velocidade média dos peixes foi 137,81% superior ao tratamento com fipronil (FIP).

A redução da velocidade média dos peixes no tratamento FIP é explicada pelo fato do fipronil afetar os sistemas sensoriais e motores do Zebrafish e ocasionar danos nas células ciliadas das linhas laterais e no tecido cerebral (WU *et al.*, 2021). A redução na velocidade em função da exposição ao fipronil também pode ser relacionado ao seu efeito negativo sobre a acetilcolinesterase (AChE), que resulta em mudanças no comportamento de natação (TILTON *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2021). Avaliando o efeito da exposição ao fipronil nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/L}$ Wu *et al.* (2021) verificaram redução da velocidade e distância da trajetória de natação do Zebrafish adulto. Redução na locomoção também foi observada em peixes-zebra expostos a mistura de fipronil (150 $\mu\text{g/L}$) e fungicidas piraclostrobina e metiltiofanato (BEVILAQUA *et al.*, 2020).

O tempo de proximidade ao predador não diferiu entre os tratamentos e o controle (Figura 16B). Evidenciado que os tratamentos não influenciaram na capacidade dos peixes de reconhecer o perigo.

Figura 16 - Velocidade média (A) e tempo de proximidade ao predador (B) de peixes *Danio rerio* em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 $\mu\text{g/L}$) (FIP), fipronil (100 $\mu\text{g/L}$) e posteriormente Mg-ferúlico + ácido gálico (FIP1), Mg-ferúlico + ácido gálico e posteriormente fipronil (FIP2), fipronil e posteriormente Mg-ferúlico (FIP3). * Médias diferem do controle (CT) de acordo com teste *t* ($p < 0,05$).



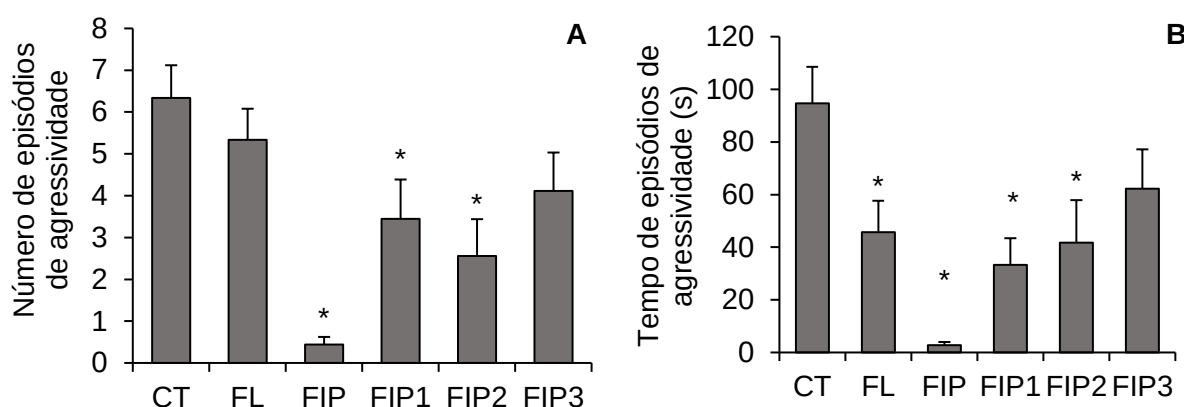
O número de episódios de agressividade nos tratamentos FIP, FIP1 e FIP2, com aplicação de fipronil e fipronil + Mg-ferúlico + ácido gálico foi menor que no controle (Figura 17A). O tempo de episódios de agressividade foi menor que o

controle nos tratamentos com aplicação de fluoxetina e naqueles com aplicação de fipronil (FIP) e fipronil + Mg-ferúlico + ácido gálico (FIP1 e FIP2) (Figura 17B).

As reações antipredatórias são imprescindíveis para garantir a sobrevivência das espécies (KELLEY; MAGURRAN, 2003). Embora os tratamentos com fipronil não tenham influenciado no reconhecimento do perigo, evidenciado pelo tempo de proximidade ao predador, as reações de agressividade foram menores nos tratamentos FIP, FIP1 e FIP2 comparado ao controle, com redução mais acentuada sob exposição apenas de fipronil (FIP). Em estudos conduzidos por Pompermaier *et al.*, (2022) a exposição ao herbicida glifosato (4,8 µg/L) também prejudicou a capacidade de reação de peixes-zebra ao predador, demonstrando que os peixes não reconheceram o risco e não conseguiram reagir ao estímulo predatório.

Nos tratamentos onde os peixes foram tratados com o Mg-ferúlico (FIP1, 2 e 3) o número e o tempo médio de episódios de agressividade foram superiores (658,25 e 1546,64 %) ao tratamento com aplicação apenas de fipronil (FIP), evidenciando a atenuação dos efeitos do fipronil sobre essas características.

Figura 17 - Número de episódios de agressividade (A) e tempo de episódios de agressividade (B) de peixes *Danio rerio* em função dos tratamentos controle (CT), aplicações de fluoxetina (FL), fipronil (100 µg/L) (FIP), fipronil (100 µg/L) e posteriormente Mg-ferúlico + ácido gálico (FIP1), Mg-ferúlico + ácido gálico e posteriormente fipronil (FIP2), fipronil e posteriormente Mg-ferúlico (FIP3). * Médias diferem do controle (CT) de acordo com teste $t(p < 0,05)$.



O fipronil altera o comportamento locomotor de peixes-zebra, o que pode afetar atividades no ambiente natural, como fuga e predação (CUENCA *et al.*, 2022). Alterações comportamentais observadas em peixes *D. rerio* adultos são resultados de estresse oxidativo, inflamação e apoptose (WU *et al.*, 2021). Desta forma a mitigação dos efeitos do fipronil nos tratamentos com aplicação de Mg-ferúlico (FIP1,

2 e 3) sobre as características interação social, velocidade média e agressividade podem ser explicados por sua atividade antioxidante.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A aplicação de fipronil a 100 µg/L resultou em redução no número de cruzamentos, interação social, velocidade média e no número e duração de episódios de agressividade nos peixes *Danio rerio* adultos. A aplicação de Mg-ferúlico antes ou após a aplicação de fipronil atenua seus efeitos nocivos sobre as características comportamentais de interação social, velocidade média e agressividade de peixes *Danio rerio*.

O estudo evidencia contribuições do Mg-ferúlico na atenuação dos efeitos do fipronil sobre o comportamento de peixes-zebra, o que se deve à sua atividade antioxidante. Para melhor compreensão dos mecanismos de proteção celular deste composto serão necessários estudos que analisem alterações bioquímicas e enzimáticas.

Os experimentos bioquímicos pa investigar a ecotoxicidade do Mg-ferúlico usando o cérebro do Zebrafish serão realizados pela pesquisadora Izionete Guiloski no Instituto de Pesquisas Pelé Pequeno Príncipe Toxicologia de Contaminantes Emergentes Curitiba, Paraná, Brasil.

Quanto à atividade do bisfenol, são necessários mais estudos de longo prazo para investigar seu impacto no estresse oxidativo, assim como o tempo necessário para que essa ação ocorra.

7. REFERÊNCIAS

ALSOP, D.; VIJAYAN, M.M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in Zebrafish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. 711-719, 2008.

ANDRÁSI, E.; IGAZ, S.; MOLNÁR, Z.; MAKÓ, S. Disturbances of magnesium concentrations in various brain areas in Alzheimer's disease. **MagnesiumResearch**, v.13, p.189-186, 2000.

ARAKI, K.; TOMA, H.E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. **Química Nova**, v. 25, p.962-975, 2002.

ATTARAN, A.; SALAHINEJAD, A.; NADERI, M.; CRANE, A.L.; NIYOGI, S.; CHIVERS, D.P. Effects of chronic exposure to selenomethionine on social learning outcomes in Zebrafish (*Danio rerio*): serotonergic dysregulation and oxidative stress in the brain. **Chemosphere**, 247, 125898, 2020.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Rsc Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BALDIN, S.L.; DE PIERI PICKLER, K.; DE FARIAS, A.C.S.; BERNARDO, H.T.; RAHISA SCUSSEL, R.; PEREIRA, B.C.; PACHECO, S.D.; DONDOSSOLA, E.R.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; WANDERLEY, A.G.; RICO, E.P. Gallic acid modulates purine metabolism and oxidative stress induced by ethanol exposure in Zebrafish brain. **Purinergic Signalling**, v. 18, p. 307-315, 2022.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

BARDGETT, M.E. Magnesium deficiency reduces fear-induced conditional lick suppression in mice. **Magnesium Research**, v. 20, p.58-65, 2007.

BARDGETT, M.E.; SCHULTHEIS, P.J.; MCGILL, D.L.; RICHMOND, R.E.; WAGGE, J.R. Magnesium deficiency impairs fear conditioning in mice. **Brain Research**, v. 1038, p.100-106, 2005.

BEVILAQUA, F., SACHETT, A., CHITOLINA, R., GARBINATO, C., GASPARETTO, H., MARCON, M.; MOCELIN, R.; DALLEGRAVE, E.; CONTERATO, G.; PIATO, A.; SIEBEL, A. M. A mixture of fipronil and fungicides induces alterations on behavioral and oxidative stress parameters in Zebrafish. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 140-147, 2020.

BRENT, R.L. Bisphenol A and obesity in children and adolescents. **JAMA**, v. 309, n. 2, p. 134-135, 2013.

BUETTNER, G.R.; DOHERTY, T.P.; PATTERSON, L.K. The kinetics of the reaction of superoxide radical with Fe (III) complexes of EDTA, DETAPAC and HEDTA. **FEBS letters**, v. 158, p. 143-146, 1983.

- CANESI, L.; FABBRI, E. Environmental effects of BPA: focus on aquatic species. **Dose Response**, v. 13, n. 3, 2015.
- CHAN, W. K.; CHAN, K. M. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in Zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. **Aquatic Toxicology**, Hong Kong, v. 108, p. 106–111, 2012.
- CHAULET, F.C.; DE ALCANTARA BARCELLOS, H.H.; FIOR, D.; POMPERMAIER, A.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; MICHELE FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Glyphosate- and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change Zebrafish behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 443-451, 2019.
- CHEN, J.; LIU, N.; LI, B.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; CAO, X. The effects of fipronil exposure on oxidative stress, non-specific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 27799-27810, 2021.
- CORREIA, D.; DOMINGUES, I.; FARIA, M.; OLIVEIRA, M. Chronic effects of fluoxetine on *Danio rerio*: a biochemical and behavioral perspective. **Applied Sciences**, 12(4), 2256, 2022.
- CUENCA, A.L.R.; SIMONATO, J.D.; MELETTI, P.C. Acute exposure of embryo, larvae and adults of *Danio rerio* to fipronil commercial formulation reveals effects on development and motor control. **Ecotoxicology**, v.31, p.114–123, 2022.
- DAGLIA, M.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S.F.; TALAS, S.Z.; NABAVI, S.M. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 362-372, 2014.
- DAS, U., MANNA, K., ADHIKARY, A., MISHRA, S., SAHA, K. D., SHARMA, R. D.; MAJUMDER, B.; DEY, S. Ferulic acid enhances the radiation sensitivity of lung and liver carcinoma cells by collapsing redox homeostasis: mechanistic involvement of Akt/p38 MAPK signalling pathway. **Free Radical Research**, v. 53, p.944-967, 2019.
- DURLACH, J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. **Magnesium Research**, v. 3, p.217-218, 1990.

EADIE, A.; VÁSQUEZ-VÉLEZ, I.C.; LIANG, X.; WANG, X.; SOUDERS, C.L.; EL CHEHOURI, J.; HOSKOTE, R.; FESWICK, A.; COWIE, A.M.; LOUGHERY, J.R.; MARTYNIUK, C.J. Residual molecular and behavioral effects of the phenylpyrazole pesticide fipronil in larval Zebrafish (*Danio rerio*) following a pulse embryonic exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology: Genomics and Proteomics**, v.36, 100743, 2020.

ENOMOTO, T.; OSUGI, T.; SATOH, H.; MCINTOSH, T. K.; NABESHIMA, T. Pre-injury magnesium treatment prevents traumatic brain injury–induced hippocampal ERK activation, neuronal loss, and cognitive dysfunction in the radial-arm maze test. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, p.783-792, 2005.

ESER, B.; TURAL, R.; GUNAL, A.C.; SEPICI DINCEL, A. Does bisphenol A bioaccumulate on Zebrafish? Determination of tissue bisphenol A level. **Biomedical Chromatography**, v. 36, n. 3, e5285, 2022.

FAHEEM, M.; LONE, K.P.O. Stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodonidella*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, 2018.

FERREIRA, J.D.B. **Efeitos comportamentais de concentração ambiental de fluoxetina em Zebrafish**. 2020. 29 p. Dissertação de mestrado — Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Urutaí, 2020.

FONSECA, R. S. **Exposição de embriões e larvas de Zebrafish a compostos bisfenólicos para elucidação de mecanismos neurotoxicológicos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

FONTANA, B.D.; MEZZOMO, N.J.; KALUEFF, A.V.; ROSEMBERG, D.B. The developing utility of Zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 157-171, jan. 2018.

GERLAI, R.; FERNANDES, Y.; PEREIRA, T. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. **Behavioural Brain Research**, v. 2, p. 318-324, 2009.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 4, p. 773-782, 2000.

GHOSH, N., CHAKRABORTY, T., MALLICK, S., MANA, S., SINGHA, D., GHOSH, B., & ROY, S. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 807-813, 2015.

GLICK, J.L. Dementias: the role of magnesium deficiency and a hypothesis concerning the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 31, p. 211-225, 1990.

HASHIMOTO, T.; NISHI, K.; NAGASAO, J.; TSUJI, S.; OYANAGI, K. Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity in dopaminergic neurons. **Brain Research**, v. 1197, p. 143-151, 2008.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89-143, 2003.

HOANE, M.R. Assessment of cognitive function following magnesium therapy in the traumatically injured brain. **Magnesium Research**, v. 20, p. 229-236, 2007.

HOANE, M.R. Treatment with magnesium improves reference memory but not working memory while reducing GFAP expression following traumatic brain injury. **Restor Neurol Neurosci**, v. 23, p. 67-77, 2005.

HUMA, S., KHAN, H.M.S., IJAZ, S., SARFRAZ, M., ZAKA, H.S., AHMAD, A. Development of niacinamide/ferulic acid-loaded multiple emulsion and its in vitro/in vivo investigation as a cosmeceutical product. **BioMed Research International**, v. 2022.

JAHNEN-DECHENT, W., KETTELER, M. Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2012.

KACHADOURIAN, R., FLAHERTY, M.M., CRUMBLISS, A.L., PATEL, M.; DAY, B.J. Synthesis and in vitro antioxidant properties of manganese (III) β -octabromo-meso-

tetrakis (4-carboxyphenyl) porphyrin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 4, p. 240-248, 2003.

KALINOWSKA, M.; GOŁĘBIEWSKA, E.; MAZUR, L.; LEWANDOWSKA, H.; PRUSZYŃSKI, M.; ŚWIDERSKI, G.; WYRWAS, M.; PAWLUCZUK, N.; LEWANDOWSKI, W. Crystal structure, spectroscopic characterization, antioxidant and cytotoxic activity of new Mg(ii) and Mn(ii)/Na(i) complexes of isoferulic acid. **Materials**, v. 14, 3236, 2021.

KALINOWSKA, M.; PIEKUT, J.; BRUSS, A.; FOLLET, C.; SIENKIEWICZ-GROMIUK, J.; ŚWISŁOCKA, R.; RZĄCZYŃSKA, Z.; LEWANDOWSKI, W. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ^1H , ^{13}C NMR, UV/VIS), thermogravimetric and antimicrobial studies of Ca (II), Mn (II), Cu (II), Zn (II) and Cd (II) complexes of ferulic acid. **Spectrochimica Acta: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 631-638, 2014.

KARLSGODT, K. H. *et al.* Diffusion Tensor Imaging of the Superior Longitudinal Fasciculus and Working Memory in Recent-Onset Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 63, p. 512-518, 2008.

KELLEY, J.L.; MAGURRAN, A.E. Learned predator recognition and antipredator responses in fishes. **Fish and Fisheries**, v. 4, n. 3, p. 216-226, 2003.

KHAN, S.; JAN, M.H.; KUMAR, D.; TELANG, A.G. Fipronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 8-14, 2015.

KI, Y.W.; LEE, J.E.; PARK, J.H.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. **Toxicology Letters**, v.211, n. 1, p. 18-28, 2012.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2161-2168, 2002.

KOSTOVA, I.; BALKANSKY, S. Metal complexes of biologically active ligands as potential antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4508-4539, 2013.

KUMAR, S.; DHAR, D. N.; SHAXENA, P. N. Applications of metal complexes of schiff bases-A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 68, p.181-187, 2009.

LEMKE, M.R. Plasma magnesium decrease and altered calcium/magnesium ratio in severe dementia of the Alzheimer type. **Biological Psychiatry**, v. 37, n. 5, p.341-343, 1995.

LIMA, D. S. *et al.* Depressão e Antidepressivos: temas geradores para discussão de conceitos químicos no nível médio de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 3, 3 fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3895/s1982-873x2013000300004>. Acesso em: 3 jun. 2024.

LIU, Y.; HUANG, J. HUANG, Z.; MEI, Yu. X.. Tissue-specific bioaccumulation and health risks of bisphenols in wild fish from West and North Rivers, South China. **Journal of Environmental Exposure Assessment**, v. 2, n. 4, 17 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.20517/jeea.2023.26>. Acesso em: 4 jun. 2024.

MAGNO, L.D.P. **Validação farmacológica da preferência claro-escuro em *Danio rerio***. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2012. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

MAGNO, L.D.P.; FONTES, A.; GONÇALVES, B.M.N.; GOUVEIA Jr, A. Pharmacological study of the light/dark preference test in Zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, 169-176, 2015.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185- 95, 2014.

MARCHI, R.C.; KOCK, F.V.; DOS CAMPOS, I.A.S.; JESUS, H.C.R.; VENÂNCIO, T., DA SILVA, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; ROLLINI, M.; LIMBO, S.; CARLOS, R.M. Antioxidant activity of an Mg (ii) compound containing ferulic acid as a chelator: potential application for active packaging and riboflavin stabilisation. **Food & Function**, v.15, n.3, p.1527-1538, 2024.

MARGARIDO, T.C.S.; FELÍCIO, A.A.; DE CERQUEIRA ROSSA-FERES, D.; DE ALMEIDA, E.A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v.91, p.61-67, 2013.

MATSUDA, H.; SAIGUSA, A.; IRISAWA, H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. **Nature**, v. 325, p.156-159, 1987.

MAXIMINO, C.; SILVA, A.W.B.; ARAÚJO, J.; LIMA, M.G.; MIRANDA, V.; B.; BENZECRY, R.; PICANÇO-DINIZ, D.L.W.; GOUVEIA, JR, A.; OLIVEIRA, K.R.M.; HERCULANO, A.M. Fingerprinting of psychoactive drugs in Zebrafish anxiety-like behaviors. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. e103943, 31 jul. 2014.

MAXIMINO, C.; MARQUES DE BRITO, T.; DIAS, C.A.G.D.M.; GOUVEIA JR, A.; MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Natureprotocols**, v. 5, n. 2, 209-216, 2010.

MAXIMINO, C.; SILVA, A.W.B.D.; GOUVEIA JR., A.; HERCULANO, A.M. (2011). Pharmacological analysis of Zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in NeuroPsychopharmacology& Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624–631, 2011.

MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; GUTHRIE, P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, v. 309, p.261-263,1984.

MOREIRA, R.A.; ARAÚJO, C.V.; DA SILVA PINTO, T.J.; DA SILVA, L.C.M.; GOULART, B.V.; VIANA, N.P.; MONTAGNER, C.C.; NARCISO, M.; ESPINDOLA, E.L.G. Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? **Chemosphere**, v. 263, 127972, 2021.

MU, X.; HUANG, Y.; LI, X.; LEI, Y.; TENG, M.; LI, X.; WANG, C.; LI, Y. Developmental effects and estrogenicity of bisphenol a alternatives in a Zebrafish embryo model. **Environmental Science and Technology**, v. 52, p. 3222-3231, 2018.

MU, Y.; GAGE, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p.85, 2011.

MUTO, A.; KAWAKAMI, K. Prey capture in Zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. **Front Neural Circuits**, v. 7, p. 110, 2013.

NAKANISHI, I.; FUKUHARA, K.; SHIMADA, T.; OHKUBO, K.; IIZUKA, Y.; INAMI, K.; MOCHIZUKI, M.; URANO, S.; ITOH, S.; MIYATAG, N.; FUKUZUMI, S. Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical derived from a vitamin E analogue: mechanistic insight into antioxidative hydrogen-transfer reaction of vitamin E. **Journal of The Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 2, n. 9, p. 1520-1524, 2002.

NASCIMENTO, G. **Desamparo aprendido com o Zebrafish (*Danio rerio*)**. 2014. 89 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2014. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, n. 5950, p. 462-465, 1984.

OLIVEIRA, R.M.M. **Novos Complexos de Ru(II) e Mg(II) com flavonóides: atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação**. 2012. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.

OYANAGI, K. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the Parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. **Neuropathology**, v. 26, p.115-128, 2006.

OYANAGI, K. The nature of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam and magnesium deficiency. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p.17-23, 2005.

PAIVA, L.B.; GOLDBECK, R.; SANTOS, W.D.; SQUINA, F.M. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 395-411, 2013.

POMPERMAIER, A., TAMAGNO, W. A., ALVES, C.; BARCELLOS, L. J. G. Persistent and transgenerational effects of pesticide residues in Zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology**, v. 262, p. 109461, 2022.

PREVEDELLO, M.T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e doenças crônicas não transmissíveis: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 55244-55285, 2021.

RIEHL, R.; KYZAR, E.; ALLAIN, A.; GREEN, J.; HOOK, M.; MONNIG, L.; RHYMES, K.; ROTH, A.; MIMI PHAM, M.; RAZAVI, R.; DILEO, J.; GAIKWAD, S.; HART, P.; KALUEFF, A.V. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult Zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 658-667, 2011.

ROBEA, M.A.; PETROVICI, A.; URECHE, D.; NICOARA, M.; CIOBICA, A.S. Histopathological and behavioral impairments in Zebrafish (*Danio rerio*) chronically exposed to a cocktail of fipronil and pyriproxyfen. **Life**, v. 13, n.9, p.1874, 2023.

RUBIN, B.S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 27-34, 2011.

SANTOS, B.R. **Validação farmacológica da esquia inibitória do *Danio Rerio***. 2013. 59 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2013. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 387-396, set. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-93322004000300015>. Acesso em: 3 jun. 2024.

SEACHRIST, D.D.; BONK, K.W.; HO, S.M.; PRINS, G.S.; SOTO, A.M.; KERI, R.A. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. **Reproductive Toxicology**, v. 59, p. 167-182, 2016.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; SRIDHAR, C.; REDDY, Y.S.R.; BIPLAB, D. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SEVERO, J.S.; MORAIS, J.B.S.; DE FREITAS, T. E.C.; CRUZ, K.J.C.; DE OLIVEIRA, A.R.S.; POLTRONIERI, F.; MARREIRO, D.D.N. Metabolic and Nutritional Aspects of Magnesium. **Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria**, v. 2, n. 35, p.67-74, 2015.

SIDDAIAH, V. Synthesis, stereochemical assignments, and biological activities of homoisoflavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2545-2551, 2006.

SIEBEL, A.M.; BONAN, C.D.; SILVA, R.S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. In: RESENDE, R.R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, p. 15-56, 2015.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P. *et al.* Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5-34, 2015.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p.71-81, 2002.

STEGEMAN, J.J.; GOLDSTONE, J.V.; HAHN, M.E. Perspectives on Zebrafish as a model in environmental toxicology. In: PERRY, S.F.; EKKER, M.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. **Fish Physiology**. Academic Press, 2010; Chapter 10, v. 29, p. 367-439.

STEWART, A.; WU, N.; CACHAT, J.; HART, P.; GAIKWAD, S.; WONG, K. *et al.* Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult Zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1421-1431, 2011.

STEWART, A.M.; NGUYEN, M.; WONG, K.; POUDEL, M.K.; KALUEFF, A.V. Developing Zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 27-36, 2014.

TAKAYANAGI, S. *et al.* Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. **Toxicology Letters**, v. 167, p. 95-105, 2006.

TILTON, F.A.; BAMMLER, T.K.; GALLAGHER, E.P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in Zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 9-16, 2011.

VANDENBERG, C.A. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 84, p. 2560-2564, 1987.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.J.; MACENA, R.H.M.; BASTOS, V.P.D. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

VELLOSA, J.C.R.; PARABOCZ, G.C.; MANENTE, F. A.; RIBAS, J.T.; LIMA, L.W. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p.305-312, 2013.

VINK, R.; NECHIFOR, M. **Magnesium in the central nervous system**. South Australia, Iasi: University of Adelaide Press, 2011.

VURAL, H.; DEMIRIN, H.; KARA, Y.; EREN, I.; DELIBAS, N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, p.169-173, 2010.

WANG, C.; QIAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, F.; ZHANG, Q.; LI, Z.; ZHAO, M. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in Zebrafish larvae at environmentally relevant levels. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 252-258, 2016.

WANG, H.; CHANG, L.; AGUILAR, J.S.; DONG, S.; HONG, Y. Bisphenol-A exposure induced neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells. **Environment International**, v. 127, p. 324-332, 2019.

WANG, X.; MARTÍNEZ, M.A.; WU, Q.; Ares, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A.; YUAN, Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n.10, p.76-899, 2016.

WEIDINGER, A.; KOZLOV A.V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v.5, p.472-484, 2015.

WENTHUR, C.J.; BENNETT, M.R.; LINDSLEY, C.W. Classics in chemical neuroscience: fluoxetine (Prozac). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 14-23, 2014.

WESTON, D.P.; LYDY, M.J. Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to benthic macroinvertebrates of urban streams. **Environmental Science & Technology**, v.48, n. 2, p. 1290-1297, 2014.

WU, C.-H.; LU, C.-W.; HSU, T.-H.; WU, W.-J.; WANG, S.-E. Neurotoxicity of fipronil affects sensory and motor systems in Zebrafish. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.177, 104896, 2021.

WU, H.; GAO, C.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; MA, E. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile Zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.115, p.9-14, 2014.

XU, H.; LIU, X.; JIA, Y.; DONG, F.; XU, J.; WU, X.; YANG, Y.; ZHENG, Y. Fipronil-induced toxic effects in Zebrafish (*Danio rerio*) larvae by using digital gene expression profiling. **Science of The Total Environment**, v.639, p.550-559, 2018.

YANG, S.J.; HWANG, S.Y.; BAIK, S.H.; LEE, K.W.; NAM, M.S.; PARK, Y.S. *et al.* Serum magnesium level is associated with type 2 diabetes in women with a history of gestational diabetes mellitus: the Korea National Diabetes Program study. **Journal Of Korean Medical Science**, v. 29 n. 1, p. 84-89, 2014.

YIN, C.L.; LU, R.G.; ZHU, J.F.; HUANG, H.M.; LIU, X.; LI, Q.F. *et al.* The study of neuroprotective effect of ferulic acid based on cell metabolomics. **European Journal of Pharmacology**, v. 864, p.172694, 2019.

ZDUŃSKA, K.; DANA, A.; KOŁODZIEJCZAK, A.; ROTSZTEJN, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. **Skin pharmacology and physiology**, v. 31, n. 6, p. 332-336, 2018.

ZINDLER, F.; STOLL, S.; BAUMANN, L.; KNOLL, S.; HUH, C.; BRAUNBECK, T. Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos? **Chemosphere**, v. 261, 127753, 2020.