



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

NATHALIA DOS SANTOS FERREIRA

**BIOACUMULAÇÃO DE As EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*): FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO
INORGÂNICO**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2018

NATHALIA DOS SANTOS FERREIRA

**BIOACUMULAÇÃO DE As EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*): FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO
INORGÂNICO**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto como parte dos requisitos para obtenção do título em Mestra em Química.

Financiadora: FAPESP – Processo 2016/05079-2

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andrea P. de Oliveira

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2018

Ferreira , Nathalia dos Santos.

Bioacumulação de As em tilápias (*Oreochromis niloticus*): fracionamento das espécies de arsênio inorgânico / Nathalia dos Santos Ferreira . -- São José do Rio Preto, 2018

80 f. : il., tabs.

Orientador: Mario Henrique Gonzalez

Coorientador: Andrea P. de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química ambiental. 2. Tilápia (Peixe) 3. Bioacumulação. 4. Arsênio. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 597

NATHALIA DOS SANTOS FERREIRA

**BIOACUMULAÇÃO DE As EM TILÁPIAS (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*): FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO
INORGÂNICO**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto como parte dos requisitos para obtenção do título em Mestra em Química.

Financiadora: FAPESP – Processo 2016/05079-2

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez (Orientador – UNESP/São José do Rio Preto - SP)

Prof^a. Dr^a. Roberta Cerasi Urban (Universidade Federal de São Carlos – São Carlos - SP)

Prof^a. Dr^a. Regina Vicenzi Oliveira (Universidade Federal de São Carlos – São Carlos - SP)

São José do Rio Preto - SP

26 de junho de 2018

*Dedico esse trabalho à minha mãe Dorcelina,
por todo incentivo, carinho e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho e me dado força e sabedoria para superar todas as dificuldades encontradas.

A minha mãe Dorcelina e minha avó Luzia, por todo amor, sacrifício e apoio incondicional, pois sem vocês eu jamais teria me tornado a pessoa que tornei hoje. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, confiando e me incentivando.

Ao meu pai Jurandir, que de onde estiver, sei que sempre estará guiando meus passos e me protegendo de todo mal.

Ao Pedro, por todo amor, carinho, paciência e por sempre acreditar em mim.

A todos meus familiares, pelo carinho e compreensão.

Ao Prof. Mario Henrique Gonzalez pela orientação, amizade, incentivo e apoio para que fosse possível realizar esse trabalho. Obrigada por sempre acreditar em mim e foi um prazer trabalhar contigo mais uma vez.

A Profa. Andrea P. de Oliveira pela co-orientação, apoio na escrita do nosso manuscrito e total disponibilidade em contribuir com o trabalho.

A Embrapa Pecuária Sudeste pela infraestrutura concedida para que fosse possível realizar todas as digestões das amostras dos ensaios de bioacumulação, em especial a Profa. Ana Rita de Araújo Nogueira e Aline Fernandes de Oliveira.

A todos do Grupo de Inovação em Química Analítica Verde (GIQAV) pela troca de experiências, ajuda e conhecimentos, em especial à Jéssica, Ana e Josi, pela amizade e momentos de descontração.

Ao programa de Pós Graduação em Química da UNESP São José do Rio Preto pela oportunidade e à todos professores que compartilharam seus conhecimentos, e que dessa forma contribuíram para a minha formação acadêmica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (Processo 2016/05079-2).

A vocês, meus sinceros agradecimentos.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

RESUMO

Um mercado que está em expansão é o de pescados, devido à busca por alimentos mais saudáveis e por conta do aumento do poder de compra da população. Entretanto, apesar dos inúmeros benefícios à saúde, os pescados podem estar expostos a diversos contaminantes inorgânicos, como é o caso do arsênio (As) que pode desencadear processos de bioacumulação nas espécies aquáticas por meio da cadeia alimentar. A determinação de As em amostras de pescado é de grande interesse analítico devido principalmente ao seu potencial de toxicidade, uma vez que seus efeitos estão intimamente relacionados às suas formas químicas e seus estados de oxidação, sendo que as formas inorgânicas de As (III) e (V) são mais tóxicas que as suas formas orgânicas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e realizar ensaios de bioacumulação com As (III) e (V) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob condições controladas em laboratório, a fim de verificar a distribuição de As nos tecidos (fígado, estômago, brânquias e filé) e assim determinar parâmetros toxicocinéticos para avaliar a capacidade de absorção e depuração deste elemento nas tilápias. As determinações de As foram realizadas pela técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) no modo padrão, e a exatidão do método foi confirmada pelas análises dos materiais de referência certificados (NIST 1640a, SRM 1566a, DORM-3 e DOLT-4), com recuperações na faixa de 80 a 110%. As concentrações de arsênio total determinadas nas tilápias expostas ao As (III) e (V) pelos ensaios de bioacumulação variaram entre 0,06 – 8,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 0,05 – 0,78 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos estômagos, 0,10 – 0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e 0,11 – 0,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos filés, evidenciando que o fígado e o estômago apresentaram maiores capacidades em absorver e acumular o contaminante. Também foi realizado um estudo de fracionamento de arsênio em tecidos de peixes e frutos do mar para avaliar a distribuição do arsênio nas fases lipídicas e proteicas, uma vez que existe uma correlação positiva entre o acúmulo de contaminantes e o conteúdo lipídico dos tecidos. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para a otimização das metodologias de extrações lipídicas e proteicas, visto que os tecidos dos ensaios de bioacumulação apresentavam baixa concentração de arsênio, não apresentando as recuperações esperadas.

Palavras-chaves: Bioacumulação; arsênio; tilápia; fracionamento; ICP-MS.

ABSTRACT

The fish market is expanding due to the search for healthier foods and because of the increase in the purchasing power of the population. However, despite the numerous health benefits, fish may be exposed to several inorganic contaminants, such as arsenic (As), which can trigger bioaccumulation processes in the aquatic species through the food chain. Thus, the determination of As in fish samples is of great analytical interest mainly due to its toxicity potential, since its effects are closely related to its chemical forms and their oxidation states, whereas the inorganic forms of As (III) and (V) are more toxic than organic forms. The aim of the present work was to develop and perform bioaccumulation assays with As (III) and (V) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions, in order to verify the distribution of As in tissues (liver, stomach, gills and fillet) and thus determine toxicokinetic parameters to evaluate the absorption and depuration capacity of this element in tilapia. The analyzes were performed using the inductively coupled plasma mass spectrometry technique (ICP-MS) in standard mode, and the accuracy of the method was confirmed by analyzes of the certified reference materials (NIST 1640a, SRM 1566a, DORM-3 and DOLT-4) which presented recoveries in the range of 80 to 110%. The concentrations of total arsenic determined in the tilapia exposed to As (III) and (V) by the bioaccumulation assays ranged from 0.06 - 8.79 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the livers, 0.05 - 0.78 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the stomachs, 0.10 - 0.41 $\mu\text{g g}^{-1}$ on the gills and 0.11 - 0.36 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the fillets, evidencing that the liver and stomach present the greatest capacities to absorb and accumulate the contaminant. A study of arsenic fractionation in fish and seafood tissues was also carried out to evaluate the distribution of arsenic in the lipid and protein phases, since there is a positive correlation between the accumulation of contaminants and the lipid content of the tissues. However, additional studies must be carried out to optimize the methodologies for lipid and protein extractions, since the tissues of the bioaccumulation assays presented low arsenic concentration and did not present the expected recoveries.

Keywords: Bioaccumulation; arsenic; tilapia; fractionation; ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais espécies de arsênio	21
Figura 2 - Esquema dos ensaios de bioacumulação	42
Figura 3 - Esquema da extração lipídica	48
Figura 4 - Esquema da extração proteica.....	49
Figura 5 - Curva analítica utilizada para a determinação de As total.....	50
Figura 6 - Tanque utilizado para a aclimatação das tilápias.....	51
Figura 7 - Montagem dos aquários para os ensaios de bioacumulação.....	52
Figura 8 - Coleta dos tecidos de interesse	53
Figura 9 - Distribuição de As total nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (III).....	55
Figura 10 - Distribuição de As total nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (V).....	56
Figura 11 - Modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem obtido por regressão não-linear para período de exposição de 7 dias ao As (III).....	58
Figura 12 - Modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem obtido por regressão não-linear para período de exposição de 7 dias ao As (V).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão das amostras de tecidos dos ensaios de bioacumulação	44
Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais do ICP-MS	45
Tabela 3 - Peso e tamanho das tilápias utilizadas nos ensaios de bioacumulação	52
Tabela 4 – Concentrações de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (III) ($n = 5, \pm \text{SD}$).....	54
Tabela 5 - Concentrações de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (V) ($n = 5, \pm \text{SD}$).....	55
Tabela 6 - Estimativas das constantes de absorção (k_a) e depuração (k_d) e fator de bioconcentração (BCF) para os tecidos de interesse durante 7 dias de exposição ao As (III) e (V).....	60
Tabela 7 - Concentração de As total nas amostras de peixes ($n=2, \pm \text{SD}$).....	62
Tabela 8 - Concentração de As no resíduo da extração lipídica e na fração lipídica ($n=2, \pm \text{SD}$).....	63
Tabela 9 – Porcentagem de extrato etéreo (gordura) e proteína bruta para as amostras de filé de Pangasius e Camarão vermelho	64
Tabela 10 - Concentração de As no resíduo da extração proteica e na fração proteica ($n=2, \pm \text{SD}$).....	64
Tabela 11 - Concentração de As total nos tecidos de filé determinado pelos ensaios de bioacumulação e a na nova digestão realizada	66
Tabela 12 - Concentração de As no resíduo da extração lipídica e na fração lipídica dos tecidos de filé do ensaio da bioacumulação.....	66

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As - Arsênio

AsB - Arsenobetaína

AsC - Arsenocolina

ATP - Trifosfato de adenosina

BCF - Fator de bioconcentração

CEUA - Comissão de Ética no Uso dos Animais

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMA - Ácido dimetilarstínico

DNOCS - Departamento Nacional de Obras contra a Seca

DRC - Célula de reação dinâmica

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

EU-RL-HM - Laboratório de Referência para Metais Pesados em Alimentos e Suplementos da União Europeia

F AAS - Espectrometria de absorção atômica por chama

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

G FAAS - Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HNO₃ - Ácido nítrico

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

iAs - Arsênio inorgânico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP OES - Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

K_a - constante de absorção

K_d – constante de depuração

KED - Discriminação por energia cinética

LANAGRO - Laboratórios Nacionais Agropecuários

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA - Ácido monometilarsônico

MPA - Ministério da Pesca e Agricultura

MRC - Material de referência certificado

MW-AD - Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

SD - Desvio padrão

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. IMPORTÂNCIA DOS PESCADOS	17
2.2. TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	18
2.3. ARSÊNIO	20
2.4. BIOACUMULAÇÃO.....	23
2.5. LEGISLAÇÃO	27
2.6. DETERMINAÇÃO TOTAL DE As EM PEIXES	29
2.7. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-MS).....	30
2.8. FRACIONAMENTO.....	32
2.8.1 Extração lipídica.....	34
2.8.2 Extração proteica	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. LIMPEZA DOS MATERIAIS	40
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES	40
4.3. ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO.....	41
4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	44
4.5. INSTRUMENTAÇÃO	44
4.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO.....	45
4.7. FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES INORGÂNICAS DE ARSÊNIO: EXTRAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA	47

4.7.1	Concentração de As total	47
4.7.2	Fracionamento lipídico e proteico	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA	50
5.2.	ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO.....	51
5.2.1	Determinação da concentração de As nas águas dos aquários	53
5.2.2	Determinação da concentração de As total nos tecidos de tilápias dos ensaios de bioacumulação	54
5.2.3	Determinação dos parâmetros toxicocinéticos	58
5.3.	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES INORGÂNICAS	62
5.3.1	Determinação do As total	62
5.3.2	Fracionamento lipídico e proteico em amostras de peixe e frutos do mar	63
5.3.3	Fracionamento lipídico e proteico nos tecidos dos ensaios da bioacumulação ..	65
6.	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Uma questão que vem sendo discutida atualmente no âmbito de segurança alimentar são as práticas comerciais adotadas pelos países para a importação e exportação de alimentos, pois cada vez mais tem se buscado alimentos seguros, que atendam a padrões mais rigorosos, livres de contaminantes e que ofereçam menores riscos à saúde dos indivíduos que os consomem. Sendo assim, trabalhos científicos que abordem esse tema agregam e trazem contribuições e informações relevantes na área econômica, ambiental e nas áreas de pesquisa e sustentabilidade.

Os pescados são alimentos mais saudáveis quando comparados a outros tipos de carnes, por serem fontes de vitaminas, proteínas e inúmeros nutrientes, além de possuir baixo teor de gordura saturada que contribuem para o bem-estar e saúde dos indivíduos (ERSOY; ÖZEREN, 2009). Segundo a Associação Brasileira de Piscicultura, o consumo de pescados aumentou no Brasil devido à consciência da população de que os pescados são fontes proteicas mais saudáveis para alimentação, além da melhora significativa no valor do preço dos peixes para os consumidores (CAMPOS, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o consumo per capita anual de pescado seja de 12 kg, entretanto segundo relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) divulgado em 2016, aponta que o consumo mundial anual per capita foi de 19,6 kg, bem acima do recomendado pela OMS (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2016). No Brasil no ano de 2015 o consumo médio per capita de pescados foi de 14,4 kg por habitante, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2017).

Apesar dos inúmeros benefícios, os pescados podem estar expostos a inúmeros contaminantes inorgânicos, como por exemplo, cobre cádmio, chumbo, arsênio e mercúrio, o que pode provocar riscos adversos a diferentes organismos. O desenvolvimento de procedimentos para avaliar a presença desses contaminantes nas águas e em outros compartimentos ambientais é de grande interesse analítico, pois através de metodologias confiáveis, rápidas e eficientes é possível realizar o seu monitoramento, verificando áreas contaminadas e possíveis ações corretivas (VICENTE-MARTORELL et al., 2009).

Dentre os diversos contaminantes que podem estar presentes nas águas o arsênio (As) pode ser encontrado naturalmente em solos e sedimentos, ou também advindo de atividades antropogênicas. Os pescados, por serem consumidores que estão no topo da cadeia alimentar aquática possuem a tendência em bioacumular As, tanto nas formas inorgânicas, mais tóxicas, quanto nas formas metiladas, de menor toxicidade (BARRA et al., 2000).

Para a determinação de elementos inorgânicos em baixas concentrações em amostras biológicas o emprego técnicas espectroanalíticas que apresentem boa sensibilidade e precisão, baixos limites de detecção, ampla faixa linear e caráter multielementar são desejadas. Dentre as técnicas mais utilizadas estão a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), juntamente com a digestão da amostra por radiação micro-ondas em frascos fechados, que garantem resultados mais precisos e exatos nas análises (PÉTURSDÓTTIR et al., 2012; WU et. al., 2014), além de minimizar os problemas de contaminação e manutenção dos elementos voláteis.

Entretanto, as maiorias das técnicas analíticas fazem a determinação da concentração total do elemento, e muitas vezes essa informação não é suficiente. As análises toxicológicas e bioquímicas mostram que a forma química de um elemento e seu estado de oxidação são de grande importância para entender os mecanismos de contaminação nos seres vivos (FRANCESCONI; KUEHNELT, 2004). Muitas vezes, a toxicidade de um determinado elemento está relacionada à forma química ou estado de oxidação, como é o caso do arsênio, que apresenta estados de oxidação +3 e +5, e, portanto possuem diferentes níveis de toxicidade (MARTINEZ et al., 2011). O fato da maioria das técnicas determinarem a concentração total de um elemento evidencia a necessidade de se realizar o monitoramento das diferentes formas químicas de um elemento, que podem ser realizado por estudos de fracionamento e/ou especiação química.

No Brasil, a legislação atual estabelece um limite máximo de arsênio total em pescados de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, segundo a RDC nº42 de 29 de agosto de 2013. Nesse contexto, devido aos limites restritivos da legislação brasileira, juntamente com a preocupação advinda do aumento do consumo de peixes pela população e possíveis riscos associados a contaminações por arsênio, é de extrema importância conhecer e monitorar as espécies presentes na amostra e não somente seus valores totais. Sendo

assim, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos de bioacumulação de As (III e V) em tilápia (*Oreochromis niloticus*), avaliando os processos de absorção e depuração do elemento e em seguida realizar o estudo de fracionamento lipídico e proteico das espécies de As, para verificar em quais das frações o arsênio inorgânico (iAs) se bioacumula em maior quantidade, bem como a determinação dos teores totais do As por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). A escolha da espécie estudada (tilápia) tem extrema importância visto que a região Noroeste Paulista é a maior produtora de tilápia de todo o estado de São Paulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DOS PESCADOS

Aquicultura é uma atividade baseada na criação de organismos aquáticos cujo ciclo de vida se dá total ou parcialmente em meio aquático para o consumo humano. Essa atividade é praticada a milhares de anos com registros que os chineses já utilizavam dessa prática, assim como os egípcios criavam tilápias há cerca de 4 mil anos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, s.d.). O consumo mundial per capita de pescados aumenta a cada ano, devido a mudanças de hábitos alimentares por parte da população, que hoje em dia busca fontes de proteínas mais saudáveis e com menores teores de gordura saturada (FIGUEIREDO JUNIOR; VALENTE JUNIOR, 2008).

Os pescados são considerados alimentos mais saudáveis, com alto teor nutritivo e baixo teor de gordura saturada. Além de ser um alimento facilmente digerido, as proteínas de alta qualidade contém todos os aminoácidos essenciais, gorduras essenciais (ômega-3), vitaminas (D, A e B) e minerais (como por exemplo, cálcio, fósforo, cobre, zinco e selênio). Sendo assim, apresenta inúmeros benefícios a saúde, como por exemplo, o fortalecimento do sistema imunológico e do cérebro, redução dos níveis de colesterol, ajuda no combate da depressão, diabetes e doenças inflamatórias, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Durante os últimos anos, o governo brasileiro vem implantando políticas que visam aumentar o consumo de peixes, e conseqüentemente o aumento da demanda no setor produtivo de pescados. A aquicultura vem crescendo a cada ano, e no ano de 2016 a produção de peixes aumentou devido principalmente ao avanço da produção de tilápias e de camarões em cativeiro, atingindo um valor de produção de R\$ 4,61 bilhões, sendo a maior parte (70,9 %) oriunda da produção de peixes. Em 2016, a produção total de peixes foi de 507,12 mil toneladas, com crescimento de 4,4 % em relação ao ano anterior apresentando um crescimento nas regiões Norte (1,4 %), Sul (6,9 %) e Sudeste (43,1 %) do Brasil. Dentre a espécie mais criada está a tilápia, com 239 mil toneladas representando 47,1% do total da pesca nacional, sendo que sua produção aumentou

9,3% em relação ao ano de 2015 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016).

2.2. TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é pertencente à família Cichlidae (ciclídeos) e é originária da Bacia do rio Nilo, na África. É uma espécie que se encontra largamente difundida em regiões tropicais e subtropicais, como Israel, Sudeste Asiático e em todo Continente Americano (EL-SAYED, 1999).

A espécie foi introduzida no Brasil em 1971 por meio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), que trouxe exemplares da Costa do Marfim para os açudes do Nordeste, difundindo-as para todo o país (AYROZA, 2009). Por ser uma espécie apropriada para a piscicultura de subsistência de países em desenvolvimento, atualmente a tilápia é a espécie mais cultivada no Brasil.

A tilapicultura surgiu como uma alternativa para a piscicultura de água doce e estuarina por conta da expansão no mercado devido principalmente a facilidade de obtenção de alevinos, alto desempenho na produção e rusticidade, grande adaptação aos sistemas de criação, boa aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentício (pescarias e frigoríficos) e pela qualidade nutritiva do peixe (MEURER et al., 2003). As tilápias são peixes tropicais cuja temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 27 a 32 °C, apresenta boa resistência quanto ao manuseio e transporte sob baixas temperaturas. Temperaturas acima de 32°C e abaixo de 27°C reduzem o apetite e o crescimento, enquanto temperaturas abaixo de 14° pode ocasionar grande mortalidade (KUBITZA; KUBITZA, 2000).

A aquicultura pode ser classificada em extensiva, semi-intensiva e intensiva. No regime extensivo utilizam-se apenas alimentos naturais, que se desenvolvem nas águas para os peixes que serão criados, não os alimentando regularmente e sem uso na água de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos. Pode se citar as explorações realizadas em açudes, represas, lagos e mananciais, que não foram construídos diretamente para o cultivo de peixes, e normalmente o homem não tem controle sobre os fluxos de entrada e saída da água (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1988).

No regime semi-intensivo por conta da alta densidade de estocagem (maior concentração de peixes) há a necessidade de se fertilizar as águas e/ou fornecer suplementos alimentares aos peixes, como grãos, farelos ou farinhas, já que o alimento natural desempenha papel principal na produtividade pesqueira. Esse tipo de modalidade é realizado em tanques, viveiros e reservatórios, nos quais o homem possui poder total do controle de entrada e saída de água. O regime intensivo é realizado em viveiros ou tanques construídos estritamente para a criação de peixes. Por haver uma quantidade bastante alta de peixes necessita-se o uso de rações balanceadas na dieta, uma vez que os alimentos naturais embora existam, se tornam insuficientes e o homem pode interferir da mesma forma que na piscicultura semi-intensiva (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1988).

O peixe escolhido para ser o objeto de estudo deste trabalho foi a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), amplamente difundida no país devido às condições climáticas favoráveis à sua criação. Dentre as características que colocam a tilápia no topo entre as principais espécies cultivadas comercialmente tem-se: a facilidade de reprodução e obtenção de alevinos, possibilidade de manipulação hormonal do sexo para obtenção de machos, bom crescimento em cultivo intensivo (5 a 500 g em 4 a 5 meses), resistência a ambientes com baixo teor de oxigênio dissolvido na água, alta resistência a doenças, carne branca e com textura firme, saborosa, baixo teor de gordura (0,9 g 100 g⁻¹ de carne) e alto rendimento do filé (35 a 40%) (AYROZA, 2009; KUBITZA; KUBITZA, 2000).

Outro fator determinante na criação das tilápias é a qualidade das águas que afeta diretamente a produção, podendo ocasionar estresse aos peixes, diminuição no apetite e maior vulnerabilidade às doenças e parasitas, levando a mortandade das espécies. (HERMES; TAKAMATSU; SEEFELD, 2009). De acordo com Kubitza e Kubitza (2000) os valores de pH devem ser mantidos entre 6,0 e 8,5, sendo que valores abaixo de 4,5 e acima de 10,5 ocasionam um aumento da mortalidade dos peixes.

A tilapicultura no Brasil é dividida basicamente em três polos, sendo eles localizados no Nordeste, no Noroeste do estado de São Paulo e no Oeste do estado do Paraná. No Noroeste do estado de São Paulo, a região que apresenta maior produtividade é Santa Fé do Sul, uma vez que a região é banhada por três grandes rios: Rio Paraná, Rio Grande e Rio Tietê (SUSSEL, 2011; PLANELLO et al., 2016).

O Noroeste do estado de São Paulo apresentou um rápido crescimento da piscicultura, especialmente na criação intensiva de tilápia e uso dos tanques-rede, levando esta região como a maior responsável na produção de pescados no estado de São Paulo. Esse rápido crescimento teve início nos anos 2000, quando as tilápias começaram a conquistar a preferência de empreendimentos do tipo pesque-pague, o que fez com que os piscicultores paulistas incluíssem a tilápia em suas criações (DE CAMPOS et al., 2007). Atualmente, o Noroeste Paulista é o principal polo de produção de tilápias do estado de São Paulo.

2.3. ARSÊNIO

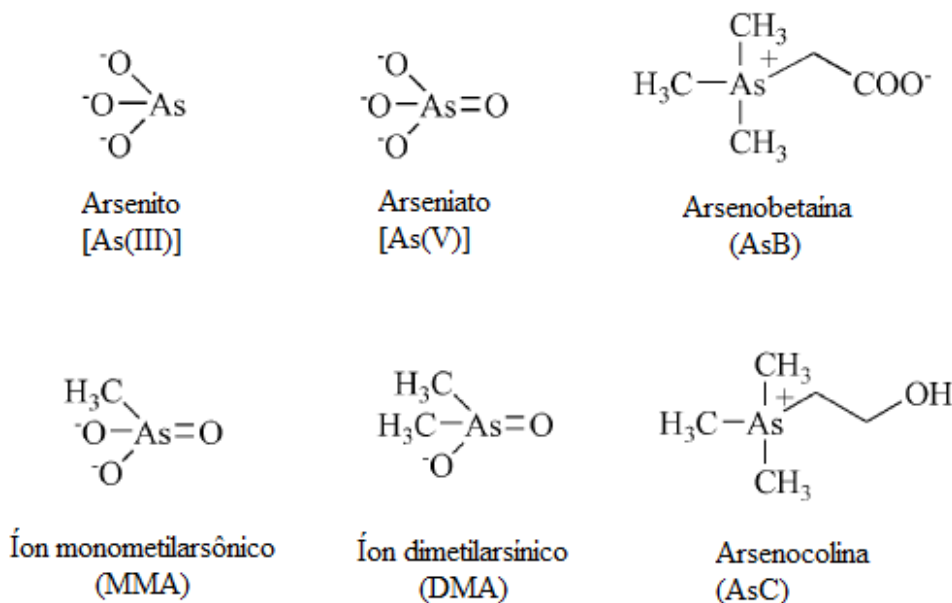
O arsênio é um elemento químico que apresenta número atômico 33 e massa atômica 74,9. É um semimetal (metaloide) encontrado no grupo 15 (VA) da tabela periódica ou família do nitrogênio. Pode formar ligações com diferentes metais e ligações covalentes com carbono, oxigênio e enxofre, e apresenta elevada toxicidade. Possui quatro estados de oxidação, que são -3, 0, +3 e +5 (BRUCE et al., 2014). É um elemento que pode ser encontrado naturalmente no ambiente aquático, e associado a diversos minerais, por exemplo, cobre chumbo, cobalto e ouro, ou ainda pela ação humana relacionada a atividades mineradoras, combustão de carvão e madeira ou ao uso de agrotóxicos que podem ser lixiviados para corpos de águas (FOWLER et al., 2007).

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) o arsênio é considerado um elemento altamente tóxico e cancerígeno para os seres humanos (Grupo 1A), que oferece toxicidade aguda crônica. Apesar das inúmeras evidências em seres humanos, os modelos animais não conseguem replicar os mesmos efeitos observados, o que dificulta a elucidação do exato modo das ações subjacentes relacionadas à carcinogenicidade (MARTINEZ et al., 2011).

O grau de toxicidade das espécies do arsênio varia de acordo com sua forma química e estado de oxidação, sendo a forma inorgânica (iAs) como a mais tóxica representada pelas espécies trivalente ou pentavalente. A forma trivalente - As (III) apresenta toxicidade por volta de 60 vezes maior quando comparada a forma pentavalente - As (V). As formas orgânicas mais comuns são o ácido monometilarsônico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaína (AsB),

arsenocolina (AsC), que estão apresentadas na Figura 1. Em termos de toxicidade, as espécies inorgânicas são cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas metiladas (MMA e DMA) (MARTINEZ et al., 2011).

Figura 1 - Principais espécies de arsênio



Fonte: adaptado (FRANCESCONI; KUEHNELT, 2004)

A exposição a arsênio inorgânico a longo prazo é associada a inúmeros efeitos adversos a saúde humana, como por exemplo, câncer de pele, pulmão, bexiga e rim, doenças cardiovasculares, como hipertensão, arritmias e disfunção vascular nos sistemas periférico e nervoso, desequilíbrio no metabolismo da glicose, além de hiperqueratose, hiperpigmentação, conjuntivite e gangrena de membros (YOSIM; BAILEY; FRY, 2015).

Apesar da exposição ao arsênio inorgânico estar associada a inúmeros efeitos adversos à saúde humana, a maneira como ele induz a esses efeitos tóxicos ainda não são amplamente conhecidas. Alguns estudos demonstram que mecanismos como inibição enzimática, interrupção do sistema endócrino, reparo de DNA alterado, estresse oxidativo nas células e modificações epigenéticas no DNA podem estar relacionadas à toxicidade do arsênio. Embora as extensões e interações desses mecanismos ainda não estejam completamente entendidas, existem evidências que indicam que o arsênio

regule genes críticos e proteínas que induzem a replicação do DNA e reparam erros, assim como os genes que controlam o metabolismo de crescimento fetal. Dessa forma, mudanças na expressão gênica podem influenciar a transcrição ou tradução do DNA (YOSIM; BAILEY; FRY, 2015).

O estresse oxidativo é tido como uma das principais teorias postuladas para a carcinogenicidade do arsênio, uma vez que ele induz a produção de espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o radical peróxil (ROO^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011). Estudos realizados por Bhattacharya and Bhattacharya (2007) descrevem picos de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células após o peixe *Clarias batrachus* (ou bagre asiático, conhecido como walking catfish) ser exposto ao As (III). Outro efeito tóxico que o As pode causar é a peroxidação lipídica, que tem sido amplamente aceita como um mecanismo de lesão celular (Halliwell and Gutteridge, 2015), e estudos conduzidos por Nandi, Patra e Swarup (2005) demonstraram aumento na extensão da peroxidação lipídica em fígado e rim de ratos expostos ao As (III).

Tanto as espécies inorgânicas quanto as espécies metiladas (MMA e DMA) demonstram inibir a respiração mitocondrial, o que provoca a formação de espécies reativas de oxigênio levando a mutações no DNA, o que possivelmente desempenham papel no desenvolvimento do câncer e morte celular. As espécies inorgânicas podem se ligar a grupos tiólicos e lipídeos da membrana, resultando em inibição de grupos funcionais de enzimas e alteração na fluidez dos lipídeos da membrana, o que altera processos bioquímicos essenciais ao organismo humano (MOLIN et al., 2015).

O As (V) possui similaridade química com o grupo fosfato, o que pode resultar na substituição do fosfato pelo arsenato (As(V)) em vias metabólicas essenciais, atuando assim como desacoplador da fosforilação oxidativa, uma vez que ocorre a formação de ADP-arsenato ao invés de ATP. O arsenato também é um desacoplador da glicólise, pois em um dos passos da via, o arsenato substitui o fosfato, assim não ocorrendo a formação de ATP (MOLIN et al., 2015).

No corpo humano, o processo de biotransformação ocorre nos rins, onde o arsênio inorgânico é metilado reduzindo sua afinidade com o tecido. As etapas de metilação são: As (V) \rightarrow As (III) \rightarrow MMA (V) \rightarrow MMA (III) \rightarrow DMA (V). Quando o

arsênio inorgânico é ingerido, ele é eliminado pela urina, que é a principal via de eliminação juntamente com os metabólitos (MMA e DMA) (BARRA et al., 2000).

Os compostos orgânicos de arsênio que estão presentes em sistemas biológicos são muito menos tóxicos. Um exemplo é a arsenobetaína (AsB) que é a principal forma orgânica encontrada nos pescados e constitui a maior fonte de arsênio na dieta, entretanto constitui a forma não tóxica de As, e é excretada na urina sem modificação, com tempo de residência relativamente curto (de 6 a 24 horas, no máximo) (BARRA et al., 2000).

Os organismos marinhos possuem maior capacidade de acumular quantidades substanciais de arsênio e de modo mais eficientes que organismos terrestres, pois o arsênio se acumula nos tecidos ao longo da cadeia alimentar, o que torna os organismos marinhos a principal fonte de transferência do contaminante a quem os consome, uma vez que eles são capazes de sofrer bioacumulação. Sendo assim é importante obter informações sobre as espécies de arsênio para se avaliar as implicações toxicológicas e entender o ciclo biogeoquímico desse contaminante no ambiente marinho (BARRA et al., 2000).

2.4. BIOACUMULAÇÃO

Os rios e mares são reservatórios de inúmeros elementos metálicos, que estão dissolvidos e são transportados pela água e são facilmente aceitos por organismos aquáticos. Os metais são introduzidos no ambiente aquático por deposição atmosférica, erosão da matriz geológica ou ainda, por fontes antropogênicas, como descarte de efluentes industriais e resíduos minerais (ALAM et al., 2002).

Dentre os organismos aquáticos, os peixes desempenham um importante papel ecológico, uma vez que são responsáveis por transferir energia dos níveis tróficos inferiores aos níveis superiores (PEREIRA et al., 2013), além de serem considerados os principais organismos viáveis para a avaliação dos graus de exposição de um determinado ambiente a elementos tóxicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os peixes por serem consumidores que estão no topo da cadeia alimentar aquática podem acumular grandes quantidades de metais da água. Os padrões de acumulação desses contaminantes variam dependendo tanto da taxa de absorção quanto da taxa de eliminação e/ou depuração (MANSOUR; SIDKY, 2002). Essa acumulação ocorre através da ingestão de alimentos ou de materiais particulados que estão suspensos na água, ou ainda pela adsorção desses metais em superfícies de tecidos ou membranas (MENDIL et al., 2005). A excreção dos metais em peixes ocorre através das fezes, urina ou pelas membranas respiratórias, e sua distribuição entre os diferentes tecidos dependem do modo de exposição, ou seja, exposição dietética e/ou aquosa (ALAM et al., 2002). A contaminação dos ecossistemas aquáticos com metais tem recebido grande atenção e nos últimos anos foram publicados inúmeros trabalhos a esse respeito, pois a bioacumulação de metais traços por peixes envolvem vários processos e mecanismos (VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011; GRECH et al., 2017).

Embora a presença de metais tóxicos na cadeia alimentar seja um risco, a toxicidade provocada à saúde humana é influenciada por diversos fatores, como idade, sexo, estilo de vida e sistema imunológico do animal. Sendo assim, o estudo sobre a prevenção da contaminação dos alimentos como peixes e frutos do mar juntamente com o monitoramento e gerenciamento dos riscos a exposição humana, a fim de garantir um alimento seguro à população é de extrema importância e alvo de muitos estudos científicos (JARDIM; CALDAS, 2009).

Segundo a Organization for Economic and Co-Operation Development (OECD), a bioacumulação é um processo pelo qual substâncias ou compostos químicos são absorvidos pelos organismos. Esse processo pode ocorrer de forma direta, onde as substâncias são assimiladas a partir do meio ambiente pelas vias oral, percutânea ou respiratória ou de forma indireta, onde a substância se acumula em organismos através da cadeia alimentar, ou ainda pela combinação das duas formas (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1994).

Os seres aquáticos apresentam alta capacidade de bioacumular arsênio de modo mais eficiente, quando comparado a organismos terrestres, seja por contato direto ou indireto, uma vez que o As se acumula ao longo da cadeia alimentar (BARRA et al., 2000). Outro fato é que os seres aquáticos ocupam os níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar e possuem a tendência a acumular As em certas partes do corpo, o que

evidencia a importância de se estudar a capacidade de bioacumulação nas mesmas (TAWHEEL; SHUHAIMI-OTHMAN; AHMAD, 2013).

Os contaminantes são absorvidos por diferentes órgãos dos seres aquáticos devido às afinidades existente entre eles, ocorrendo assim sua bioacumulação. (BERVOETS; BLUST, 2003). Nos peixes, os contaminantes são absorvidos primeiramente nas brânquias, pois ela está em contato direto com o corpo d'água e são locais de trocas gasosas respiratórias (GARG; GUPTA; JAIN, 2009). Apesar de possuir uma capacidade metabólica baixa, pode contribuir para evitar o acúmulo dos contaminantes em outros órgãos, uma vez que as brânquias podem metabolizar os contaminantes antes de eles chegarem ao fígado (MDEGELA et al., 2006).

O fígado é o tecido mais recomendado para realizar um estudo de poluição de um corpo d'água, uma vez que as maiores concentrações de contaminantes estão presentes nele sendo o principal órgão para a metabolização e toxicidade do arsênio (LICATA et al., 2005). Devido às características anatômicas e fisiológicas, como por exemplo, composição lipídica, alta atividade metabólica e grande aporte de sangue recebido fazem com que o fígado seja um órgão que acumula As em grande quantidade (SQUADRONE et al., 2013). Os músculos (filés) geralmente apresentam as menores concentrações de As (LIAO et al., 2003; OLIVEIRA et al. 2017), o que é especialmente importante para a dieta humana, uma vez que se trata da parte comestível do peixe.

Nos últimos anos, inúmeros estudos vêm sendo reportados sobre a bioacumulação de As em peixes, e estes estudos concentram-se principalmente nas partes comestíveis (músculo), assim como em diferentes órgãos como brânquias, fígado, rins e trato digestivo. Attar et al. (1992) determinaram níveis de arsênio em peixes do Golfo Árabe, sendo encontradas concentrações na faixa de 0,16 a 32,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de As total em tecido muscular. Liao et al. (2003) avaliaram a toxicidade aguda e a bioacumulação de As em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) e obtiveram concentrações de 12,65 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas vísceras, e 3,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos músculos, e de acordo com estes estudos uma forma de reduzir a quantidade de arsênio ingerido seria cozinhar o peixe, segundo os autores.

Chen e Liao (2004) realizaram ensaios de bioacumulação com tilápia (*Oreochromis mossambicus*) a fim de verificar a cinética de absorção e depuração do As (III) nas brânquias por meio de um modelo de bioacumulação unicompartmental, e

como resultado para as constantes de absorção e depuração obtiveram um valor de $0,26 \pm 0,09 \text{ mL g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,08 \pm 0,01 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. O fator de bioconcentração calculado foi de $3,21 \text{ mL g}^{-1}$, que indica que as brânquias possuem potencial para acumular As quando as tilápias estão expostas a ambientes contaminados.

Pazhanisamy, Vasanthi e Indra (2006) avaliaram a bioacumulação de As no peixe *Labeo rohita*, e as maiores concentrações foram determinadas no fígado ($1,00 \pm 0,0034 \mu\text{g g}^{-1}$), enquanto que as menores concentrações estavam no filé ($0,53 \pm 0,0010 \mu\text{g g}^{-1}$). Ventura-Lima et al. (2009) investigaram os efeitos de bioacumulação do As (III) e (V) a curto e longo prazo nas brânquias e fígado de carpas (*Cyprinus carpio*) por meio da acumulação e estudo de especiação química do arsênio, bem como pela ação e atividade da enzima glutathione-S-transferase, que é responsável pela biotransformação do arsênio inorgânico. Os resultados gerais deste estudo indicaram que a exposição de *C. carpio* a As (III) e (V) induz diferentes respostas nas brânquias e no fígado deste organismo aquático.

Estudos conduzidos por Agah et al. (2010) mostraram que os tecidos do fígado apresentavam maiores concentrações de arsênio, em comparação com os tecidos dos músculos. Zhang, Huang e Wang (2011) avaliaram a bioacumulação de As (V) no peixe *Terapon jarbua*, e obtiveram concentrações na faixa de $0,5$ a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. As constantes de absorção e depuração foram $0,0015 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $0,03 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, e por meio desse estudo foi possível demonstrar que o As (V) tem baixa disponibilidade para *T. jarbua*.

Schenone, Vackova e Fernandez Cirelli (2014) determinaram a concentração de As por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) nos músculos, fígado, gônadas, pele e escamas de três espécies de peixes (*Odontesthes bonariensis*, *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus*), e em todos os peixes as maiores concentrações de As foram determinadas nos fígados e filé, seguindo os mesmos padrões de bioacumulação. Em estudos mais recentes, Oliveira et al. (2017) avaliaram a distribuição e bioacumulação de As total em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em diferentes ambientes, e relataram que a concentração encontrada nas vísceras (estômago, brânquias e fígado) foi de $0,485 \pm 0,225 \mu\text{g g}^{-1}$ e na porção consumível (músculo) foi $0,030 \pm 0,008 \mu\text{g g}^{-1}$, abaixo do nível máximo de As estabelecido pelas agências reguladoras internacionais.

Chen et al. (2018) estudaram mecanismos de aclimação em peixes após exposições crônicas. Os estudos foram conduzidos com As (III) e (V) em *Oryzias mekongensis* e examinaram a bioacumulação e biotransformação do As, assim como a toxicocinética do As após exposição. A bioacumulação de As nos peixes expostos ao As (V) aumentou gradualmente durante o período inicial de exposição de 21 dias e em seguida diminuiu no período de depuração (28 dias), indicando que ocorreu aclimação para regular os níveis totais de arsênio. As constantes de absorção diminuíram significativamente, enquanto que as constantes de depuração aumentaram significativamente, demonstrando a redução na bioacumulação do As.

Por fim, estudos de bioacumulação em diferentes tecidos ajudam a compreender melhor as capacidades de metabolização e o potencial toxicológico do arsênio em organismos aquáticos.

2.5. LEGISLAÇÃO

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza o controle dos resíduos e contaminantes, através dos laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO), que são centros de referências em análises alimentares e atuam no monitoramento e investigação de contaminantes, assim como na pesquisa e desenvolvimento/aplicação de métodos analíticos (QUEIROZ; LINS, 2012).

O arsênio está entre substâncias tóxicas controladas pelo MAPA, e seu limite máximo aceito em pescados de captura e de cultivo é de 1 mg kg^{-1} , de acordo com a RDC N° 42, de 29 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013). Entretanto, esse valor estabelecido refere-se apenas ao arsênio total, pois as amostras não são submetidas à especificação química ou quantificação das frações orgânica e inorgânica (BRASIL, MAPA, 2016).

Diferente do Brasil, países como Nova Zelândia e Austrália adotam legislações para limites máximos de arsênio inorgânico para pescados e frutos do mar. Os limites máximos estabelecidos para arsênio inorgânico em peixes e crustáceos é de 2 mg kg^{-1} (AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY, 2017). Na Europa não existe nenhuma legislação vigente quanto a um limite máximo permitido para arsênio total

e/ou arsênio inorgânico em pescados, porém a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) publicou no ano de 2009, um relatório científico, onde destacou a importância de se realizar o controle dos níveis das diferentes espécies de arsênio em alimentos, como peixes e frutos do mar, assim como a determinação de arsênio inorgânico por um método analítico robusto e preciso. Além disso, esse relatório demonstrou a necessidade de se produzir materiais de referência certificado para arsênio inorgânico (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009).

Diante desse problema relatado pela EFSA, o Laboratório de Referência para Metais Pesados em Alimentos e Suplementos da União Europeia (EU-RL-HM) em 2010 realizou um teste interlaboratorial a fim de desenvolver um material de referência a partir de uma amostra de fígado de peixe para a determinação de arsênio inorgânico. Entretanto, essa determinação apresentou diversos problemas analíticos, o que impossibilitou obter um valor preciso para arsênio inorgânico nesse material desenvolvido, sendo necessário realizar mais estudos nos processos de extração e separação das espécies do arsênio (DE LA CALLE et al., 2012).

Em termos de águas, em janeiro de 2001, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) promulgou um novo regulamento para arsênio em água potável adotando um limite máximo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, substituindo o valor de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ estabelecido em 1975 (SMITH et al., 2002).

No Brasil, a resolução nº 357, de 17 de março 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, assim como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelecendo o mesmo valor ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) para a concentração de arsênio total em águas doces e salinas de classe 1, enquanto que para as mesmas águas onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo, o valor máximo permitido passa ser $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). O anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 29 de setembro de 2017 (antiga Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde) dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece o valor máximo permitido de arsênio em águas para consumo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, mesmo valor adotado pela US EPA e pela resolução nº 357 do CONAMA.

2.6. DETERMINAÇÃO TOTAL DE As EM PEIXES

Como foi citado anteriormente, o arsênio é um elemento tóxico que pode estar presente em pescados em casos específicos e seu valor de referência é controlado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que é uma ferramenta de gerenciamento de risco adotada pelo MAPA com objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil (BRASIL, MAPA, 2017). Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias mais exatas e precisas para determinação de arsênio é de grande importância.

Os pescados compõem uma parcela de importância na dieta humana, e consequentemente podem se tornar fontes de contaminantes como o arsênio, que na maioria das vezes pode estar em sua forma orgânica, que apresenta baixa toxicidade e nenhuma metabolização no organismo (OLIVEIRA, 2017).

Devido à baixa concentração de arsênio em amostras de pescados o emprego de técnicas sensíveis se faz necessário, sendo a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) uma das mais empregadas devido a seu caráter multielementar e aplicabilidade para análise de traços. A determinação por ICP-MS requer um procedimento adequado de preparo de amostra, para minimizar os efeitos matriciais e que sejam compatíveis com os requisitos operacionais do equipamento, como baixa acidez final (1 a 2%) e baixo teor de sólidos dissolvidos (0,2 a 2%) (KRUG, 2008).

Diversos estudos descrevem o uso de ICP-MS juntamente com digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) em frascos fechados como a melhor escolha no preparo de amostras para a garantia de resultados mais precisos e exatos nas análises (WU et al., 2014; FONTCUBERTA et al., 2011; PÉTURSDÓTTIR et al., 2012). A digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados é um método rápido, faz o uso de reagentes com alto grau de pureza, apresenta menores riscos de contaminação justamente por ser realizada em sistema fechado e melhor manutenção de elementos voláteis, porém é um procedimento que pode ter um custo elevado (AGAZZI; PIROLA, 2000).

Os reagentes mais utilizados nos procedimentos de digestão assistida por radiação micro-ondas para amostras ambientais são ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e diversos estudos foram desenvolvidos empregando ácidos diluídos, a fim de otimizar procedimentos e reduzir a quantidade de reagentes e resíduos gerados. Foster et al. (2007) relataram o uso de ácido nítrico diluído para a extração e quantificação das espécies de As em amostras biológicas marinhas, e as melhores recuperações obtidas foram utilizando HNO_3 2% v/v. Gonzalez et al. (2009) avaliaram a decomposição de amostras vegetais e animais com misturas de ácido nítrico (2,0, 7,0 e 14 mol L^{-1}) e H_2O_2 , e os melhores resultados obtidos foram utilizando HNO_3 $7,0 \text{ mol L}^{-1}$, com menores concentrações de carbono residual. Desta forma, é possível digerir amostras de tecido animal utilizando ácido nítrico diluído, pois há uma redução no volume dos reagentes, o qual está de acordo com os princípios da química verde (ROCHA et al., 2013).

A maior dificuldade apresentada na determinação de arsênio total em amostras de peixes é a presença de arsenobetaína, espécie orgânica considerada não tóxica e de difícil decomposição, além de ser quimicamente estável. Alguns estudos indicam que a concentração de arsenobetaína em peixes é tida com a concentração total de As, quando determinada somente por técnicas de quantificação, por ser a espécie encontrada em maior quantidade em peixes. Sendo assim, utilizam-se ácidos oxidantes para a digestão para que ocorra a conversão das espécies orgânicas em inorgânicas, e assim realizar a determinação total de As (NARUKAWA et al., 2008). Em um estudo conduzidos por Kalantzi et al. (2017) em peixes coletados ao longo da costa da Grécia, os níveis de As total variaram de 11,8 a $62,6 \text{ mg As kg}^{-1}$, entretanto a principal espécie encontrada foi a arsenobetaína, que representou entre 67 a 97% do As total.

2.7. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-MS)

A determinação de metais e diversos não-metais em amostras biológicas pode ser realizada por inúmeras técnicas analíticas, como por exemplo, a espectrometria de absorção por chama (F AAS) e forno de grafite (G FAAS), espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma acoplado

indutivamente (ICP-MS). Dentre essas técnicas, a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente é umas das técnicas mais utilizadas na determinação de elementos traços, e apresenta inúmeras vantagens, como análise multielementar e isotópica, ampla faixa linear, espectro relativamente simples, alta sensibilidade, precisão e exatidão, além da possibilidade de acoplamento às técnicas de separação (PRÖFROCK; PRANGE, 2012).

O ICP-MS oferece inúmeras vantagens, sendo que seus limites de detecção podem chegar à ordem de ng kg^{-1} devido à geração de grande quantidade de íons no plasma, e esses limites podem ser melhorados utilizando células de reação ou colisão para eliminar interferências. Hoje em dia, a maior parte dos equipamentos vem equipados com essas células, oferecendo uma nova maneira de minimizar as interferências espectrais poliatômicas, por meio do uso de um gás que irá sofrer colisão ou reação com os interferentes (THOMAS, 2008).

Diante das inúmeras vantagens apresentadas sobre a técnica de ICP-MS, nos últimos anos ela tem se tornado essencial na análise de especiação e fracionamento de diversos elementos químicos. No entanto, a determinação de arsênio por ICP-MS pode sofrer algumas interferências espectrais, pois a determinação de $^{75}\text{As}^+$ é afetado pelo íon molecular $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. O efeito desse íon pode ser contornado utilizando-se equações de correção matemática, o emprego de células de colisão/reação através da inserção de gases (H_2 , He, NH_3 e entre outros) dentre outras ferramentas.

As equações de correção matemáticas estão baseadas na medida da intensidade do interferente em outra massa, geralmente livre de interferentes, sendo a correção baseada na razão dessas duas espécies (THOMAS, 2008). As células de colisão/reação são preenchidas por um gás e operadas a uma potência de radiofrequência (RF), onde os íons moleculares interferentes são destruídos através de colisões ou reações. A remoção do interferente pode ser pela discriminação por energia cinética (KED) ou discriminação por massa (THOMAS, 2008).

No modo KED, os íons poliatômicos interferentes colidem com um gás inerte, geralmente He, para dissociá-lo e modificar sua energia cinética, de forma que os produtos de colisão tenham a mesma energia que o potencial da célula, sendo então discriminados e rejeitados, enquanto que os analitos de maior energia que a célula são transmitidos e direcionados ao analisador de massas. Já, no modo de discriminação por

massa ou DRC (Célula de reação dinâmica) utiliza-se um gás reativo (NH_3 , CH_4 ou O) que é inserido na célula reagindo com o íon poliatômico interferente, convertendo-o em uma espécie neutra ou de massa diferente do analito. Desta forma, o analito sem a presença do interferente passará por um filtro de massa seletivo e será guiado ao analisador de massa. (THOMAS, 2008).

Em um estudo realizado por Oliveira et. al (2017) foi desenvolvido um método analítico para a determinação de As em amostras de peixes empregando o ICP-MS no modo KED, o qual foram avaliados diferentes fluxos de gás He com intuito da minimização da espécie molecular interferente. Por fim, a melhor condição otimizada foi empregando o fluxo de gás He de 2 mL min^{-1} , com recuperações aceitáveis para os materiais de referência.

2.8. FRACIONAMENTO

Nos últimos anos foram desenvolvidas inúmeras pesquisas científicas que envolvem a otimização de métodos analíticos capazes de fornecer informações sobre toxicidade, biodisponibilidade, função bioquímica e mobilidade de elementos inorgânicos. Muitas vezes, apenas a análise total de um elemento químico na amostra não é suficiente para fornecer essas informações, assim sendo necessários estudos de fracionamento de espécies químicas (MATOS, 2011).

Um exemplo claro que demonstra que apenas a determinação total de um elemento pode não trazer informações adequadas ou necessárias é a diferença de toxicidade quanto às distintas formas químicas de um elemento, como por exemplo, o arsênio. O arsênio é um elemento que pode existir tanto na forma orgânica como inorgânica, sendo que as espécies orgânicas são menos tóxicas que as espécies inorgânicas. Dessa forma, métodos analíticos que envolvam o fracionamento das espécies para a determinação da concentração total de um elemento nas diferentes frações são alvo do nosso trabalho, uma vez que se tem a necessidade de conhecer as espécies presentes na amostra e não mais só a concentração total de um elemento.

De acordo com a IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) o fracionamento consiste em um processo de classificação de um analito ou grupo de analitos de uma amostra de acordo com características físicas (por exemplo, tamanho e

solubilidade) ou químicas (por exemplo, tipo de ligação e reatividade) (TEMPLETON et al., 2000). O preparo de amostra utilizado nos procedimentos que envolvam o fracionamento químico consiste em submeter à amostra a consecutivas etapas de extração com reagentes com propriedades químicas diferentes (acidez, potencial redox, polaridade e propriedades complexantes) a fim de se obter diferentes frações com características distintas do elemento de interesse. Após realizada as extrações, a determinação total do elemento é realizada nas diferentes frações, através de técnicas analíticas sensíveis que possibilitem realizar essa quantificação, uma vez que o elemento irá estar em baixas concentrações (MATOS, 2011).

Na literatura existem inúmeros trabalhos que reportam o desenvolvimento de metodologias para a determinação total de As em amostras de tecidos de peixes, assim como metodologias aplicadas a estudos de especiação química. No entanto, não foram encontradas informações quanto à forma que o As se encontra distribuído em diferentes frações do tecido, o que poderia ajudar a compreender melhor o papel do As nos processos de bioacumulação. Assim, existe a necessidade de avaliar metodologias para a análise de fracionamento nesse tipo de matriz.

Em sistemas aquáticos, substâncias tóxicas tendem a concentrar-se principalmente na fração lipídica dos organismos, que são caracterizadas por lipídios polares e não polares. Sendo assim, técnicas de extração apropriadas baseadas em sistemas de solventes com a polaridade correta é essencial para o sucesso da metodologia. O uso de clorofórmio e metanol foi recomendado para a extração lipídica em amostras de tecidos de peixes (SCHLECHTRIEM; FLIEDNER; SCHÄFERS, 2012).

Inúmeros solventes podem ser utilizados nos procedimentos de fracionamento, o que leva a obtenção de diferentes frações com características distintas. Sendo assim, este trabalho visa realizar procedimentos de extrações sequenciais em amostras de filé, que são a parte consumível do peixe, a fim de se obter as frações lipídicas e proteicas, pois apesar de haver indícios que a maior parte do iAs esteja nessa fração com maiores teores de gordura é importante estudar outras frações, como a fração proteica.

2.8.1 Extração lipídica

No preparo de amostras para o fracionamento são utilizados diversos métodos de extração sólido-líquido, assim como diferentes solventes/extratores são usados para conseguir extrair as espécies orgânicas e inorgânicas da amostra. Os lipídios constituem diversos grupos de compostos orgânicos formados por cadeias longas de carbono, e são relativamente insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, como por exemplo, clorofórmio, éter, hexano e benzeno (LIM; YILDIRIM-AKSOY; KLESIUS, 2011).

A extração de lipídios é importante do ponto de vista ambiental, pois ela auxilia no monitoramento dos contaminantes, que são quantificados em maiores concentrações, geralmente, na fração com elevados teores de gordura. As amostras necessitam de cuidados especiais na obtenção dessa fração, pois fatores como a oxidação indesejada e co-extração de componentes não-lipídicos podem influenciar diretamente na qualidade final do extrato (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D´ARCE, 2009).

Nos alimentos, os lipídios podem estar ligados a proteínas e aos carboidratos, por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, interações de Van der Waals ou ainda, ligações de hidrogênio ((FIORI; SCINTU; ADDIS, 2013). Tal fato dificulta o processo da extração lipídica, pois o solvente utilizado ou mistura de solventes deve possuir elevada solubilidade com os lipídios da amostra, ou seja, ser polar para conseguir remover os lipídios que estão associados às membranas celulares e os constituintes do tecido, e também apolar para conseguir solubilizar os lipídios apolares, juntamente com baixa solubilidade em proteínas e carboidratos, além de conseguir penetrar entre as partículas da amostra e possuir um ponto de ebulição relativamente baixo para evaporação (IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

Os lipídeos apresentam uma faixa relativa de hidrofobicidade, o que torna praticamente inviável a utilização de um único solvente na extração. Os lipídios neutros são ligados covalentemente e podem ser extraídos com solventes apolares; já os lipídios polares que são ligados por forças eletrostáticas e por ligações de hidrogênio, necessitam de solventes polares para clivagem destas ligações (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D´ARCE, 2009).

Os principais métodos utilizados para a extração lipídica são Soxhlet (1879), Folch et al. (1957) e Bligh & Dyer (1959). No método de Soxhlet é utilizado um solvente (geralmente éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano) em refluxo durante muitas horas, e a amostra é exposta ao oxigênio, luz e calor, o que favorece reações de oxidação e hidrólise, o que pode comprometer o extrato lipídico, assim como a sua quantificação. Diferente do método de Soxhlet, que é uma extração a quente, o método Folch et al. (1957), é uma extração a frio, que emprega a mistura dos solventes clorofórmio e metanol, seguida da adição de uma solução de cloreto de potássio, com função de melhorar a separação das fases, tornando este método mais efetivo que o Soxhlet. O método Bligh & Dyer (1959) é uma modificação simplificada do método de Folch et al. (1957), pois utiliza menores proporções de solvente e amostra, além de ser um “método rápido para extração e purificação dos lipídios totais”.

Cada metodologia apresenta suas vantagens e desvantagens, como a toxicidade dos solventes utilizados e a indesejável extração de contaminantes não-lipídicos da fase orgânica, no entanto os métodos de Folch et al. (1957) e Bligh & Dyer (1959) são ainda largamente utilizados na extração lipídica, tanto na sua forma original, como modificados. Além disso, existe uma vantagem em utilizar a mistura de clorofórmio e metanol, pois ela é capaz de extrair eficientemente tanto os lipídios neutros como os polares (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D´ARCE, 2009).

Diversos estudos indicam que dependendo do tecido a ser analisado, a escolha do método pode influenciar significativamente no resultado final. A OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) possui uma diretriz (OECD 305) que visa a determinação do fator de bioconcentração em peixes, e de acordo com estudos existe uma correlação positiva significativa entre o acúmulo de um contaminante e o conteúdo lipídico dos organismos. Sendo assim, a OECD indica que métodos de extração apropriados utilizando solventes apolares e polares são necessários para garantir a extração completa de lipídios totais em amostras de tecidos de peixe, recomendando o uso de clorofórmio e metanol para a extração (SCHLECHTRIEM; FLIEDNER; SCHÄFERS, 2012).

2.8.2 Extração proteica

As proteínas são moléculas orgânicas constituídas por cadeias de aminoácidos ligadas por ligações peptídicas, e exercem diferentes funções no organismo, como o controle intra e extracelular; são componentes estruturais essenciais das células, além de controlar transformações moleculares que definem o metabolismo por meio da catálise proteica (ROSTOM; SHINE, 2018). As proteínas são moléculas extremamente instáveis quando não estão em seu ambiente nativo, portanto, uma vez extraídas do seu meio biológico, elas ficam expostas a diversos agentes que podem comprometer irreversivelmente suas estruturas e assim podem rapidamente perder a habilidade em desempenhar suas funções específicas (NOVÁK; HAVLÍČEK, 2016).

Por conta dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que estão presentes em suas estruturas, a solubilidade das proteínas irá depender da concentração de sais dissolvidos, pH, temperatura e da polaridade do solvente utilizado para a extração. Essas variáveis podem ser manipuladas para precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto que outras podem se manter solúveis em soluções (MATULIS, 2016).

A separação das proteínas de outras macromoléculas envolvem diferentes propriedades físico-químicas, sendo necessário eliminar seletivamente os outros componentes da mistura, de tal forma que somente a fração proteica reste ao final. A precipitação é atingida por conta das diferenças de solubilidade no meio reacional, e pode ser realizada pela adição de um sal (efeito conhecido como “salting out”), por um solvente orgânico (efeito da polaridade) ou por dímeros orgânicos (efeito de agregação), ou ainda modificando o pH e/ou a temperatura do meio (JIANG; HE; FOUNTOULAKIS, 2004).

O efeito de precipitação de proteínas pelo uso de solventes orgânicos é um dos mais utilizados, sendo os solventes mais utilizados o etanol e a acetona, pois provocam a diminuição da solubilidade da maior parte das proteínas globulares, levando a sua precipitação. O etanol e a acetona possuem constantes dielétricas inferiores a da água, e quando adicionados em solução proteica aquosa aumentam as forças de atração entre as cargas opostas causando a redução do grau de ionização e /ou protonação dos grupos ácidos e básicos da molécula proteica, provocando assim a agregação das proteínas, e a consequente precipitação (SIMPSON; BEYNON, 2010). Um outro fato importante que

deve-se levar em consideração é a realização do procedimento em temperaturas entre 0 e 4 °C, pois em temperaturas acima de 10 °C na presença de solvente orgânicos, as proteínas podem sofrer desnaturação, por conta da desestabilização das interações hidrofóbicas intramoleculares (FONG; WU; WOOD, 2009).

Por fim, as extrações proteicas são de grande importância, uma vez que não há na literatura estudos a respeito de como o iAs se encontra bioacumulado nessas frações, visto que contaminantes tendem a se bioacumularem tecidos que apresentam maior teor maior de gordura.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto teve como objetivo principal realizar ensaios de bioacumulação com As (III) e (V) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em condições controladas e determinar a concentração total de As nos tecidos de fígado, estômago, brânquias e filés (músculo) por meio da técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

O desenvolvimento de metodologias de fracionamento lipídico e proteico das espécies de As inorgânico (iAs) em diferentes amostras de peixes (filé de Abrótea, Pangasius e Tilápia) e frutos do mar (Camarão vermelho) foi avaliado. Após a otimização das melhores condições de preparo de amostra para o fracionamento, tal metodologia foi aplicada em amostras de filés de tilápias proveniente dos estudos de bioacumulação para avaliar a distribuição do iAs nas frações lipídicas e proteicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a determinação de As total por ICP-MS empregando a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) e emprego de amostras de referências certificadas para a avaliação de alguns parâmetros de desempenho do método proposto;
- Realização de ensaios de bioacumulação sob condições laboratoriais controladas e apropriadas de cultivo com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas à uma concentração fixa de As (III) e (V) separadamente;
- Determinação de As total nos tecidos de interesse (fígado, estômago, brânquias e filés) das tilápias dos ensaios de bioacumulação com As (III) e (V) por ICP-MS, assim como a avaliação da distribuição de As pelos tecidos e determinação de parâmetros toxicocinéticos;

- Otimização de métodos de fracionamento lipídico e proteico em amostras de peixes (filé de Abrótea, Pangasius e Tilápia) e frutos do mar (Camarão vermelho) baseados em extrações sequencias e posterior análise em ICP-MS;
- Estudo da distribuição de As inorgânico nas frações lipídicas e proteicas dos filés provenientes dos ensaios de bioacumulação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LIMPEZA DOS MATERIAIS

Todas as vidrarias, frascos, tubos de ensaios e ponteiros utilizados nos procedimentos foram previamente lavados com Extran®, detergente livre de metais, e colocadas em banho de ácido nítrico 10% (v/v) durante 24 horas, para descontaminação e desmineralização destes materiais. Em seguida foram enxaguados com água deionizada ultrapura e deixadas secar em temperatura ambiente por 24 horas.

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo das soluções analíticas e soluções de calibração para a determinação do arsênio por ICP-MS foi utilizado uma solução estoque de arsênio $1000 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ (Fluka® Analytical traceCERT® CRMs for ICP-MS) por meio de diluições intermediárias. Para as digestões ácidas assistidas por radiação micro-ondas (MW-AD) foi utilizado soluções de ácido nítrico concentrado subdestilado e posteriormente diluídos (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich) 30% (v/v).

Para os ensaios de bioacumulação de As (III) e (V) com tilápias foram preparadas soluções a partir dos sais arsenito de sódio (AsNaO_2 , Sigma-Aldrich) e arseniato de sódio heptahidratado ($\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), respectivamente.

O gás utilizado como gerador de plasma e para nebulização e como gás auxiliar foi o argônio (99,999%) fornecido pela White Martins (Sertãozinho, São Paulo). Materiais de referência certificados como NIST 1640a (trace elements in water), SRM 1566a (Oyster Tissue), NRCC DORM-3 (Fish Protein) e NRCC DOLT-4 (Dogfish liver) foram utilizados para otimização do método e avaliação da exatidão.

Para o fracionamento lipídico e proteico nas amostras de tecido de peixes e frutos do mar foi utilizado clorofórmio, metanol, hidróxido de sódio, acetona e ácido fosfórico, todos provenientes da Sigma-Aldrich.

4.3. ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO

Toda metodologia aplicada nesse estudo foi avaliada e aprovada (Processo CEUA-146/2016) pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UNESP, órgão responsável pela avaliação e acompanhamento de projetos de ensino, pesquisa e extensão que envolvam experimentação e uso de animais, levando em consideração as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os ensaios de bioacumulação podem ser realizados por diferentes regimes de exposição, e a escolha do tipo de ensaio dependerá dos objetivos, recursos existentes, necessidades dos organismos-teste e características dos efluentes (resíduos) e sua toxicidade (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1992; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996). Os regimes de exposição podem ser estático, semi-estático ou de fluxo contínuo. No nosso trabalho o regime escolhido foi o estático, onde os organismos-teste foram expostos à mesma solução durante todo o ensaio, pois se trata de um modelo simples e de baixo custo, que não necessita de muitos recursos, além de gerar uma menor quantidade de resíduos quando comparados com os regimes semi-estático ou de fluxo contínuo.

Os peixes utilizados nos ensaios de bioacumulação foram adquiridos com o responsável dos tanques de piscicultura da UNESP, Campus de São José do Rio Preto. Todo o experimento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Liao et al. (2003), onde os peixes estavam livres de lesões, deformidades ou doenças. Os peixes foram distribuídos em tanques de 450 L, com oxigenação constante e temperatura controlada (27 ± 2 °C) e permaneceram por um período de 14 dias de aclimação, onde foram alimentados diariamente.

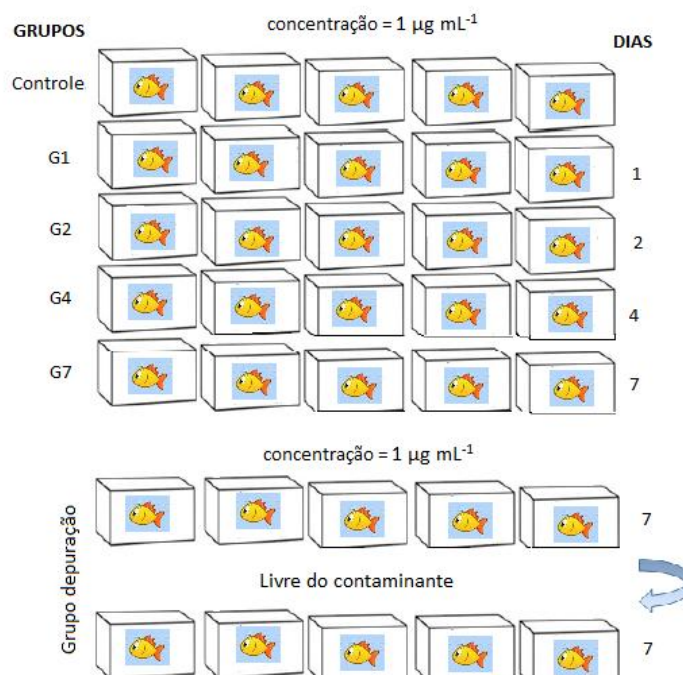
Após o período de aclimação, os peixes foram alocados individualmente em aquários retangulares de plástico de 25 L com seus parâmetros físico-químicos controlados, visando a não mortalidade da população de peixes em estudo. Os ensaios com As (III) e (V) foram realizados separadamente, e as concentrações foram fixadas em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em cada aquário, e essa concentração empregada deve se ao fato da

necessidade de elevadas concentrações para produzir efeitos tóxicos nos tecidos, e assim possibilitar a avaliação da toxicocinética do arsênio nos peixes (TSAI; LIAO, 2006).

Foram preparadas soluções de As (III) e (V) dissolvendo uma quantidade calculada dos sais de arsenito de sódio (AsNaO_2) e arseniato de sódio heptahidratado ($\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada. Em seguida, foram realizadas diluições dessas soluções com água de torneira, a fim de se obter a concentração nominal de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em cada aquário, que também foi avaliada por ICP-MS.

O ensaio de bioacumulação foi realizado dividindo as tilápias em 6 grupos (Controle, G1, G2, G4, G7 e grupo depuração), onde em cada grupo continha 5 indivíduos ($n=5$), conforme mostrado na Figura 2. Os grupos G1, G2, G4, G7 foram referentes aos dias de teste 1, 2, 4, 7 dias. Os peixes do grupo “Controle” não foram expostos ao As e foram induzidos a morte no final do experimento, enquanto que os outros grupos foram expostos ao As a uma concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, e retirados da água após 1, 2, 4 e 7 dias, respectivamente. Os indivíduos do grupo depuração foram expostos ao contaminante por 7 dias, e em seguida foram alocados para aquários livre de contaminante por mais 7 dias, totalizando 14 dias de ensaio.

Figura 2 - Esquema dos ensaios de bioacumulação



Fonte: autoria própria.

Ao final de cada dia de experimento, os indivíduos do grupo em questão foram coletados e anestesiados em uma solução que continha benzocaína 28 mg L^{-1} , e assim induzidos à morte. Em seguida, com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica, os tecidos de interesse (filé, fígado, brânquias e estômago) foram coletados, e em seguida congelados, liofilizados e digeridos para posterior análise em ICP-MS. A fim de se avaliar a concentração de As nos aquários foram coletadas diariamente pequenas alíquotas de água dos aquários ($100 \mu\text{L}$) que foram diluídas em 10 mL de água deionizada para análise em ICP-MS.

Os parâmetros toxicinéticos (constantes de absorção e depuração) para cada tecido em questão foram determinadas ajustando a forma integrada da Equação 1 através dos perfis de acumulação do As (III) e (V) nos tecidos de interesse e a concentração da água contaminada por meio de uma regressão não-linear (LIAO et al., 2003; TSAI; LIAO, 2006; TSAI et al., 2012; CHEN; LIAO, 2012).

$$C_o(t) = C_o(t = 0) e^{-k_d t} + \frac{k_a}{k_d} C_a (1 - e^{-k_d t}) \quad (\text{Equação 1})$$

onde $C_o(t)$ é a concentração de As dependente do tempo determinado no tecido de interesse ($\mu\text{g g}^{-1}$), $C_o(t=0)$ é a concentração de As no tecido no início do ensaio ($\mu\text{g g}^{-1}$), k_a é a constante de absorção específica de cada tecido ($\text{mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), k_d é a constante de depuração (d^{-1}), t é o tempo em dias, e C_a é a concentração de As na água ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

O parâmetro fator de bioconcentração (BCF) foi calculado como $BCF = k_a/k_d$, representando a capacidade de acumulação líquida que é o resultado da competição entre os processos de absorção e depuração que ocorrem durante os ensaios.

O software OriginPro 9.0 (*OriginLab Corporation*) foi utilizado para realizar a análise não linear, executando todos os ajustes da curva, assim como para calcular o coeficiente de determinação (R^2) e realizar análises estatísticas (análise de variância – ANOVA), onde a significância estatística foi justificada se os valores de p fossem inferiores a 0,05.

4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram levadas à Embrapa Pecuária Sudeste, localizada na cidade de São Carlos no estado de São Paulo, para a etapas de moagem e digestão. O preparo de amostra foi adaptado do método proposto por Gonzalez et al. (2009). As amostras de fígados, brânquias e estômagos foram maceradas, enquanto que as amostras de filés foram moídas criogenicamente utilizando um moinho pulverizador criogênico modelo MA775 (Marconi, Piracicaba, São Paulo).

As digestões ácidas assistidas por radiação micro-ondas (MW-AD) foram realizadas empregando um forno micro-ondas tipo cavidade modelo Microwave Reaction System (Multiwave PRO - Anton Paar GmbH, Graz, Áustria). As amostras foram pesadas em alíquotas entre 50 a 200 mg, pois variaram de acordo com o peso do tecido retirado da tilápia e digeridas em frascos fechados com 6 mL de solução de ácido nítrico 50% subdestilado e 2 mL de peróxido de hidrogênio (30% v/v) empregando o programa de aquecimento mostrado na Tabela 1. Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos para balões volumétricos, e tiveram seus volumes ajustados quantitativamente com água deionizada.

Tabela 1 - Programa de aquecimento do micro-ondas para digestão das amostras de tecidos dos ensaios de bioacumulação

Etapa	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo de digestão (min)
1	1100	190	40
Resfriamento	0	0	10

4.5. INSTRUMENTAÇÃO

A determinação de arsênio total nas amostras de tecidos bioacumulados foi realizada com o emprego de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) modelo NexION 300X (Perkin Elmer, Shelton, CT) operado em modo padrão. Entretanto, o equipamento também pode operar utilizando a cela de

colisão por discriminação da energia cinética (KED), a qual emprega gás hélio, como gás colisional.

Os parâmetros operacionais e instrumentais do equipamento utilizado durante as análises foram otimizados de acordo com a otimização proposta por Oliveira et al. (2017), que determinou As em tecidos de tilápia por ICP-MS, e são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais e instrumentais do ICP-MS

Parâmetros operacionais e instrumentais	
Potência RF	1600 W
Vazão do gás do plasma	18 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	1,01 L min ⁻¹
Voltagem da entrada	-3,00 V
Voltagem da saída	-32,00 V
Número de varredura por leitura (sweeps)	50
Número de leituras (readings)	1
Número de replicatas	3
Tempo de espera (dwell time)	25 s
Rpq	0,25 v
Faixa de calibração	0,1 - 20 µg L ⁻¹

4.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO

A validação de um método analítico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017). Para isso, alguns parâmetros devem ser seguidos, entre eles, seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão e robustez. Entretanto, esses parâmetros podem sofrer variações dependendo do tipo de ensaio (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011).

Foi preparada uma curva analítica (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg L⁻¹) a partir de uma solução estoque de arsênio 1000 ± 2 mg L⁻¹ para realizar a calibração

do equipamento e buscou-se obter coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,99. Através da análise dos brancos e do coeficiente angular da curva analítica foi possível obter os limites de detecção e quantificação, LOD e LOQ, respectivamente.

O limite de detecção corresponde a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005). É obtido através da equação:

$$LD = 3 \frac{Sb}{b} \quad (\text{Equação 2})$$

onde “Sb” representa o desvio padrão de 10 medidas da intensidade do branco e “b” representa o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação corresponde a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão (repetitividade) e exatidão (ICH, 2005). É obtido de forma semelhante ao limite de detecção, modificando apenas o fator 3 por 10:

$$LQ = 10 \frac{Sb}{b} \quad (\text{Equação 3})$$

Com o propósito de avaliar a exatidão dos dados foram utilizados materiais de referência certificados (MRC) que representassem a matriz trabalhada durante as análises, e eles avaliam a tendência ou a recuperação de um método e é realizada através dos resultados obtidos nas análises com os materiais de referência certificados. Sendo assim, o fator de recuperação é calculado pela Equação 4 (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2011):

$$F (\text{recuperação}) = \frac{C_{\text{determinada}}}{C_{\text{MRC}}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde “C_{determinada}” é a concentração determinada pelo equipamento do MRC e “C_{MRC}” é a concentração declarada no certificado do material de referência.

4.7. FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES INORGÂNICAS DE ARSÊNIO: EXTRAÇÃO LIPÍDICA E PROTEICA

Para a otimização dos métodos de extração e fracionamento de As foram utilizadas amostras de tecidos de peixes alvo dos estudos do grupo de pesquisa (GIQAV). As amostras em questão foram filé de Abrótea (*Urophycis brasiliensis*), filé de Pangásius (*Pangasianodon hypophthalmus*), filé de Tilápia e Camarão vermelho adquiridos em mercados locais.

Foram adotados procedimentos de preparo de amostra para a determinação total de As nesses tecidos e em diferentes frações obtidas por meio de extrações sequenciais a fim de se obter as frações de lipídios e proteínas, conforme a metodologia proposta por Kannamkumarath et al. (2002).

4.7.1 Concentração de As total

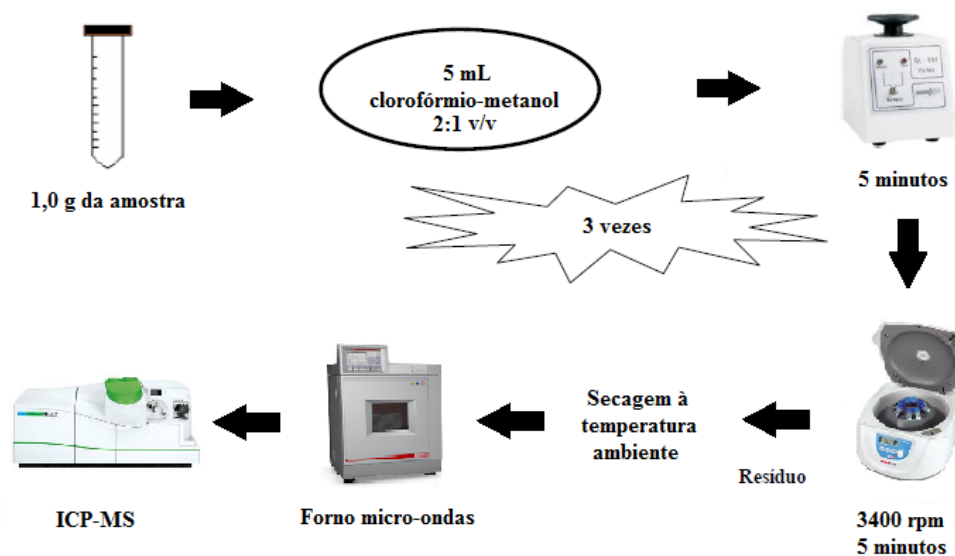
A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) foi realizada em todos os tecidos que foram acima citados para a determinação da concentração de As total. O procedimento experimental e todas as informações foram apresentadas no item 4.4.

4.7.2 Fracionamento lipídico e proteico

A extração lipídica nas amostras de tecidos de peixes foi promovida pela adição de 5 mL da mistura clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) à uma massa de 1,0 g da amostra moída. A amostra juntamente com a solução de clorofórmio-metanol foi agitada por 5 minutos em um agitador tipo Vórtex, e em seguida foi centrifugada por 5 minutos à 3400 rpm para a separação das fases. As alíquotas de clorofórmio-metanol foram recolhidas com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para um tubo Falcon. Esse procedimento foi realizado por três vezes na mesma amostra e as três frações de solvente orgânico foram re combinadas. Vale destacar que esse procedimento foi realizado em duplicata, e está representado na Figura 3.

O resíduo da extração (tecido sem gordura) foi seco à temperatura ambiente, e em seguida uma massa de 200 mg foram pesadas e levadas a digestão em forno de micro-ondas utilizando o mesmo programa de digestão empregado anteriormente (item 4.4).

Figura 3 - Esquema da extração lipídica



Fonte: adaptado (MATOS, 2011).

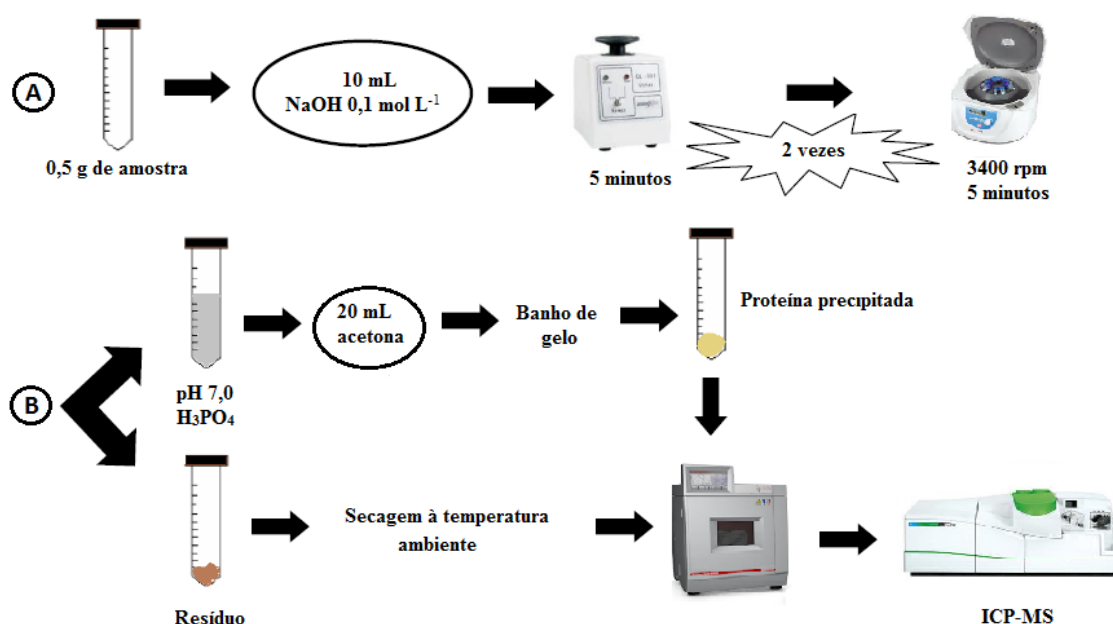
A concentração de As total na fração lipídica foi determinado pela diferença da concentração total de As na amostra e a concentração de As total na amostra após a extração, devido à massa de gordura obtida na extração ser insuficiente para a digestão em duplicata.

As extrações proteicas foram realizadas nas massas das amostras obtidas após as extrações lipídicas depois da evaporação da mistura de solventes orgânicos à temperatura ambiente. Em aproximadamente 0,5 g da amostra restante adicionou-se 10 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução foi agitada por 5 minutos em agitador do tipo Vórtex, e em seguida, foi centrifugada por 5 min a 3400 rpm para separação das fases. O sobrenadante (extrato) foi recolhido com o auxílio de uma micropipeta, e transferido para um novo tubo Falcon. Esse procedimento foi realizado por duas vezes na mesma amostra e os extratos recolhidos foram combinados. O resíduo da extração foi

seco à temperatura ambiente, para em seguida ser digerido em forno micro-ondas e analisado por ICP-MS.

Os extratos que foram combinados tiveram seus pHs ajustados para 7,0 utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4), e em seguida adicionado 20 mL de acetona. Após a adição, os extratos foram colocados em banho de gelo por 30 minutos para que ocorresse a formação de um precipitado. O precipitado formado foi centrifugado (3400 rpm) e seco a temperatura ambiente, para que em seguida fosse digerido em forno de micro-ondas e analisado em ICP-MS. Todo procedimento foi realizado em duplicata e está ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Esquema da extração proteica



Fonte: adaptado (MATOS, 2011).

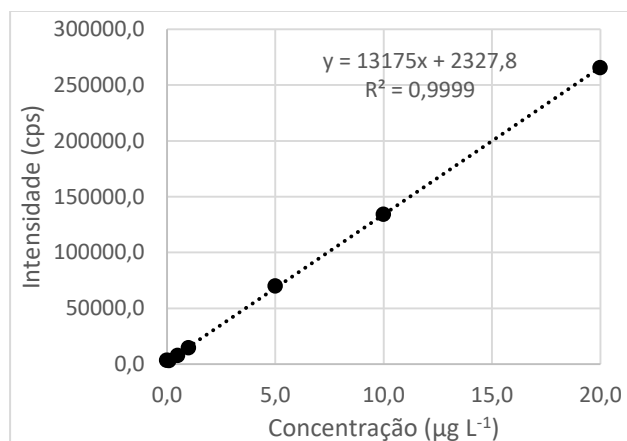
Após as extrações serem realizadas, as determinações de As foram realizadas nas frações lipídicas e proteicas por ICP-MS. Inicialmente, as extrações e o fracionamento das espécies de arsênio inorgânico (As-i) foram realizadas em tecidos de peixes alvo de estudos do grupo de pesquisa (GIQAV) para que toda metodologia pudesse ser desenvolvida e otimizada. Após realizado esse estudo de otimização de metodologia, a mesma foi aplicada aos tecidos de filés das tilápias dos ensaios de bioacumulação com As (III) e (V).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESEMPENHO DA METODOLOGIA

Inicialmente foi preparada uma curva analítica com concentrações crescentes de As ($0,1 - 20,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em meio de HNO_3 1% v/v, para verificar a linearidade através dos coeficientes de correlação linear. As intensidades foram registradas pelo equipamento e foram utilizadas para construção do gráfico como mostrado na Figura 5. O coeficiente de determinação (R^2) obtido apresentou valores dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 0,90 e 0,99, respectivamente. A partir de 10 medidas do branco analítico e dos coeficientes angulares da curva analítica foi possível calcular os limites de detecção e quantificação, $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 5 - Curva analítica utilizada para a determinação de As total



Por meio da análise dos materiais de referência certificado foi possível avaliar a exatidão do método, sendo utilizado como materiais de referência certificados o NIST 1640a (trace elements in water), SRM 1566a (Oyster Tissue), NRCC DORM-3 (Fish Protein) e NRCC DOLT-4 (Dogfish liver). Os valores de recuperação foram 87, 90, 98 e 91%, respectivamente, e estão dentro dos limites aceitáveis (80 – 110%).

5.2. ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO

Os ensaios de bioacumulação para As (III) foram iniciados em julho de 2016, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP com o projeto “Avaliação da bioacumulação de arsênio e dos riscos associados ao consumo de peixes no Brasil”, processo 146/2016. O aluno de mestrado do nosso grupo de pesquisa (Luciano Henrique Barca de Oliveira) realizou estudos de bioacumulação com As (III) e obteve resultados prévios, os quais foram compilados nessa dissertação juntamente com os resultados obtidos nos ensaios de bioacumulação com As (V).

Inicialmente, as tilápias foram coletadas dos tanques de piscicultura do câmpus pelo responsável, e em seguida foram transferidos para caixas de água de 450 L, com oxigenação constante e temperatura controlada para período de aclimação de 14 dias, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Tanque utilizado para a aclimação das tilápias



De acordo com Ohki et al. (2002), a mortalidade durante o período de aclimação deveria ser menor que 5%, o que foi observado nestes ensaios. Os peixes estavam livres de doenças ou deformidades e não houve crescimento significativo durante o período de

aclimatação. A Tabela 3 apresenta o peso e tamanho dos peixes que foram utilizados nos ensaios de bioacumulação para As (III) e (V).

Tabela 3 - Peso e tamanho das tilápias utilizadas nos ensaios de bioacumulação

		As (III)					
	Controle	G1	G2	G4	G7	G14	
Peso (g)	74,6 ± 25,7	106,4 ± 21,5	117,5 ± 26,8	90,6 ± 21,8	111,6 ± 27,3	101,3 ± 22,7	
Tamanho (cm)	13,8 ± 1,6	15,5 ± 1,3	16,3 ± 1,4	14,2 ± 1,5	15,5 ± 1,6	15,5 ± 1,3	
		As (V)					
	Controle	G1	G2	G4	G7	G14	
Peso (g)	65 ± 14,5	75 ± 18,2	69,1 ± 11,6	68,3 ± 21,8	75 ± 9,4	129,6 ± 12,2	
Tamanho (cm)	13,1 ± 1,1	14 ± 1,3	13,7 ± 0,8	13,6 ± 1,6	13,7 ± 1,4	16,4 ± 0,7	

Os ensaios de bioacumulação foram realizados a uma concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de arsênio durante 7 dias, com base no experimento realizado por Tsai e Liao (2006), e essa concentração é cerca de 20 a 50 vezes maior do que o observado para produzir efeitos elevados nos tecidos alvo, e assim avaliar a toxicocinética do elemento.

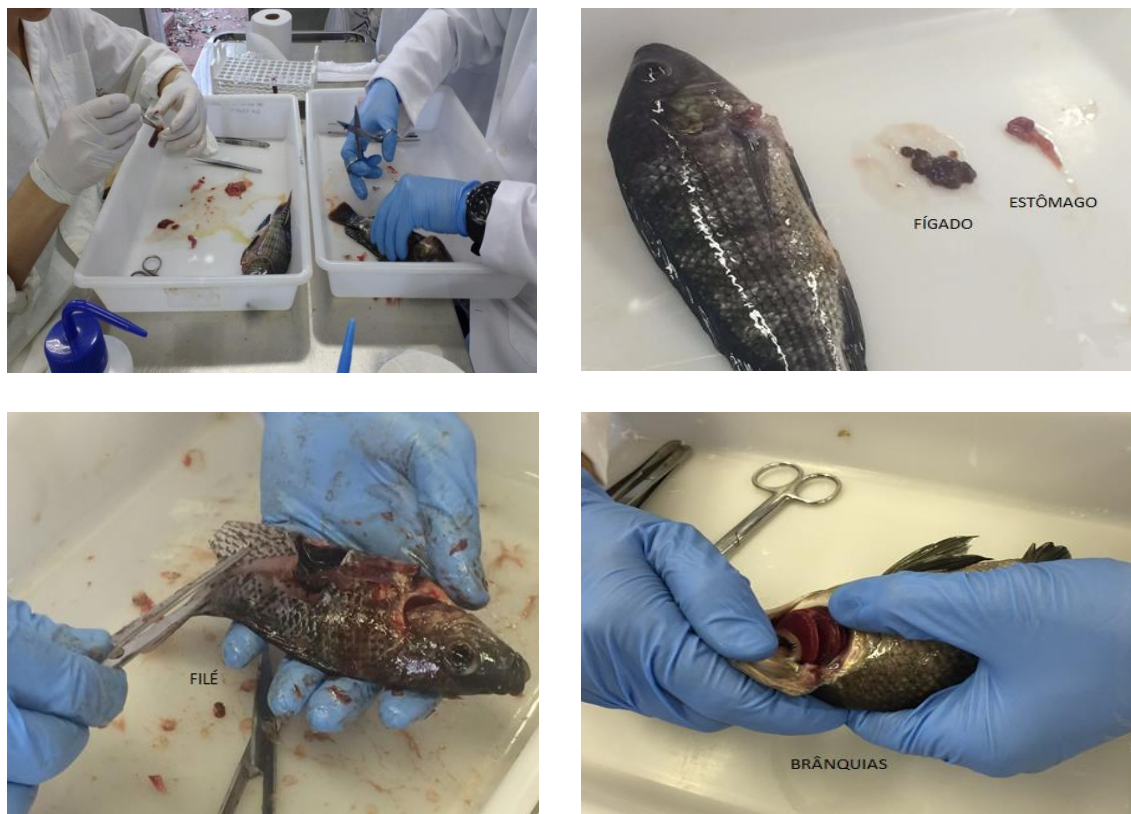
Primeiramente foi realizado o ensaio com As (III), e ao final desse ensaio foi iniciado o ensaio com o As (V). Os dois ensaios foram conduzidos da mesma maneira, e a forma como foi montado o experimento pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7 - Montagem dos aquários para os ensaios de bioacumulação



Ao final de cada dia de teste, as tilápias foram anestesiadas e mortas por overdose em uma solução de benzocaína 28 mg L^{-1} como recomenda o protocolo e os tecidos de interesse foram retirados para seguir a etapa de preparo de amostra, como representado na Figura 8.

Figura 8 - Coleta dos tecidos de interesse



5.2.1 Determinação da concentração de As nas águas dos aquários

Para monitoramento e avaliação da concentração de As nos aquários foram coletadas ao final de cada dia de experimento pequenas alíquotas de água dos aquários ($100 \mu\text{L}$), que foram diluídas em 10 mL para análise em ICP-MS. No ensaio de bioacumulação realizado com As (III) a média da concentração da água foi $1,09 \pm 0,19 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que para a água do ensaio de bioacumulação com As (V) a média da concentração foi $1,11 \pm 0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para ambos os ensaios, as águas dos grupos

controle e depuração estavam abaixo do limite de quantificação determinado por ICP-MS ($1,8 \times 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$).

5.2.2 Determinação da concentração de As total nos tecidos de tilápias dos ensaios de bioacumulação

Os estudos de bioacumulação em diferentes tecidos podem fornecer uma melhor compreensão da capacidade de metabolização e do potencial toxicológico do As em organismos aquáticos. Ao final de cada dia do ensaio de bioacumulação, os tecidos de interesse (filé, fígado, brânquias e estômago) foram coletados e congelados para posteriores procedimentos experimentais já descritos (item 4.4). Para as tilápias expostas ao As (III), as maiores concentrações foram determinadas no fígado e estômago, seguidas das brânquias e filés. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração de As total em cada tecido das tilápias do ensaio de bioacumulação com As (III).

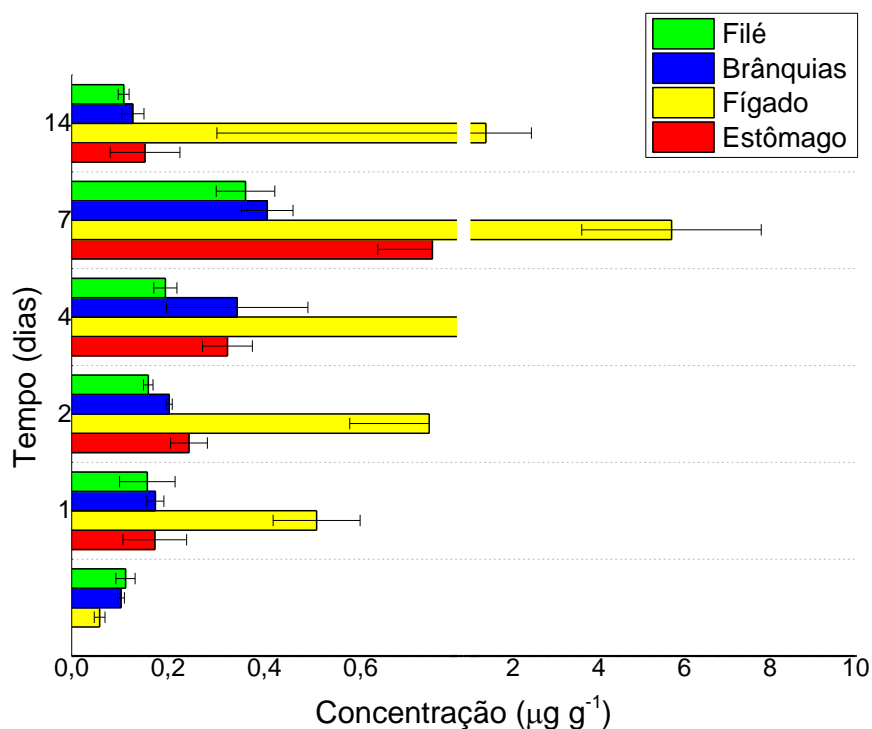
Tabela 4 – Concentrações de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (III) (n = 5, \pm SD)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Filé
Controle	$0,06 \pm 0,01$	< LOQ*	$0,10 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$
Dia 1	$0,51 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,06$
Dia 2	$0,74 \pm 0,16$	$0,24 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
Dia 4	$0,96 \pm 0,37$	$0,32 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,15$	$0,19 \pm 0,02$
Dia 7	$5,70 \pm 2,10$	$0,75 \pm 0,11$	$0,41 \pm 0,05$	$0,36 \pm 0,06$
Depuração	$1,36 \pm 1,06$	$0,15 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$

* LOQ = $0,007 \mu\text{g g}^{-1}$

A Figura 9 apresenta a distribuição de As total nos diferentes tecidos durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (III).

Figura 9 - Distribuição de As total nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (III)



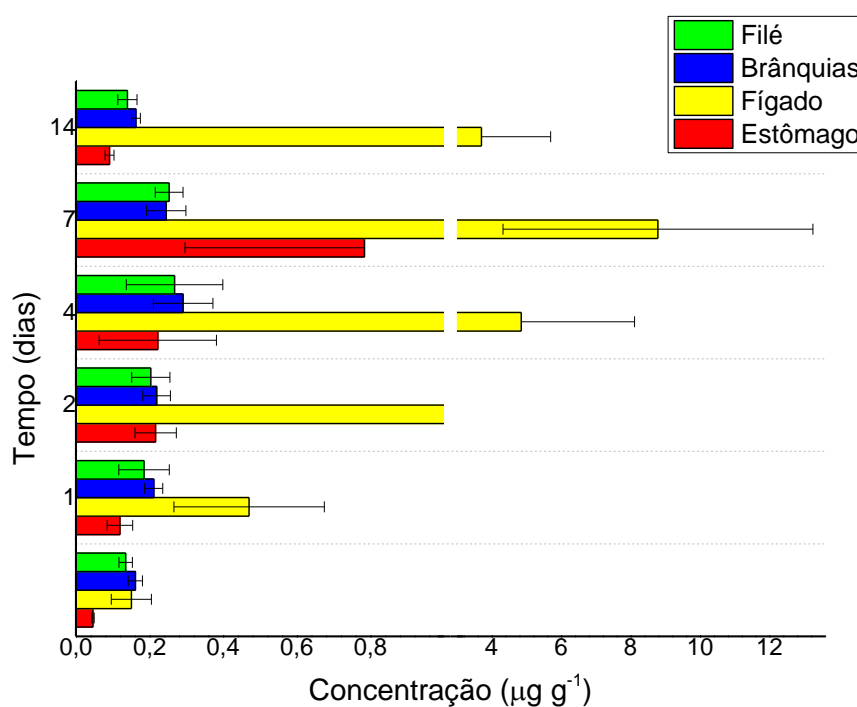
Para as tilápias expostas ao As (V), as maiores concentrações foram determinadas no fígado e estômago, seguidas das brânquias e filés. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na determinação da concentração de As total em cada tecido das tilápias do ensaio de bioacumulação com As (V).

Tabela 5 - Concentrações de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (V) (n = 5, \pm SD)

Grupos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Fígado	Estômago	Brânquias	Filé
Controle	0,15 \pm 0,05	0,05 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02
Dia 1	0,47 \pm 0,20	0,12 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	0,19 \pm 0,07
Dia 2	2,19 \pm 0,96	0,22 \pm 0,06	0,22 \pm 0,04	0,20 \pm 0,05
Dia 4	4,85 \pm 3,27	0,22 \pm 0,16	0,29 \pm 0,08	0,27 \pm 0,13
Dia 7	8,79 \pm 4,46	0,78 \pm 0,49	0,25 \pm 0,05	0,25 \pm 0,04
Depuração	3,71 \pm 1,99	0,09 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03

A Figura 10 apresenta a distribuição de As total nos diferentes tecidos durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (V).

Figura 10 - Distribuição de As total nos diferentes tecidos das tilápias durante os períodos de exposição e depuração do ensaio de bioacumulação com As (V)



Para ambos os ensaios, as concentrações nos tecidos aumentaram dia a dia durante o período de exposição, onde as tilápias foram expostas a uma concentração fixa de As por um período de 7 dias. No grupo depuração os animais foram alocados para aquários livre do contaminante por mais 7 dias (período de depuração), durante os quais puderam eliminar as espécies de As, reduzindo as concentrações de As nos tecidos avaliados.

A partir dos ensaios de bioacumulação com As (III) e (V) foi possível observar que em ambos os casos a ordem de bioacumulação foi: fígado > estômago > brânquias > filé. De acordo com Tsai et al. (2012) os tecidos fígado e estômago possuem a maior capacidade de absorver o contaminante, uma vez que esses órgãos atuam como locais de armazenamento de As a longo prazo sob exposição crônica.

Os tecidos de fígado são frequentemente recomendados como indicador ambiental para poluição das águas, podendo ser explicado pelo fato do fígado possuir a tendência em acumular poluentes de vários tipos, principalmente metais. Segundo a literatura, o fígado apresenta um papel importante no armazenamento, redistribuição, desintoxicação ou transformação de contaminantes, e atua também como um local ativo de efeitos patológicos induzidos por contaminantes (LICATA et.al., 2005).

Os resultados obtidos para ambos os ensaios de bioacumulação realizados mostrou que as brânquias e o filé apresentaram as menores concentrações de As, o que está de acordo com o estudo realizado por Tsai e Liao (2006), onde as menores concentrações de As encontravam-se nas brânquias e no filé da tilápia (*Oreochromis mossambicus*).

Embora existam vários estudos na área, ainda não se tem o entendimento completo sobre os mecanismos e processos que envolvam a bioacumulação de arsênio em tilápias, especialmente na forma como ele é captado/absorvido pelos tecidos. As brânquias são órgãos responsáveis pelo transporte iônico, trocas gasosas e excreção de resíduos, e segundo estudos é a principal via de absorção, pois se inicia por elas, e em seguida o contaminante é transferido para o sangue, e assim distribuído por todo o corpo. Sendo assim, as brânquias apresentam papel fundamental nos mecanismos de captação de contaminantes, possuindo grande importância no entendimento de toxicologia aquática (CHEN; LIAO, 2004).

Pelos resultados obtidos nos ensaios de bioacumulação foi possível observar que a maior concentração de As foi determinada no fígado para o ensaio com As (V), o que pode estar relacionado à similaridade do As (V) com o grupo fosfato, que participa de inúmeras reações bioquímicas. O As (V) age como um desacoplador da fosforilação oxidativa, ou seja, impede a formação do gradiente de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, e a energia que seria utilizada para a síntese de ATP é dissipada na forma de calor (MOLIN et al., 2015). Este fenômeno pode ser entendido como mimetismo, onde o corpo do peixe quando em contato com a espécie As (V), o reconhece como um grupo fosfato, aumentando sua absorção, pois o As (V) é menos tóxico quando comparado ao As (III).

Em trabalhos anteriores, Schlechtriem, Fliedner e Schäfers (2012) encontraram uma correlação positiva significativa entre o acúmulo de contaminantes e o conteúdo

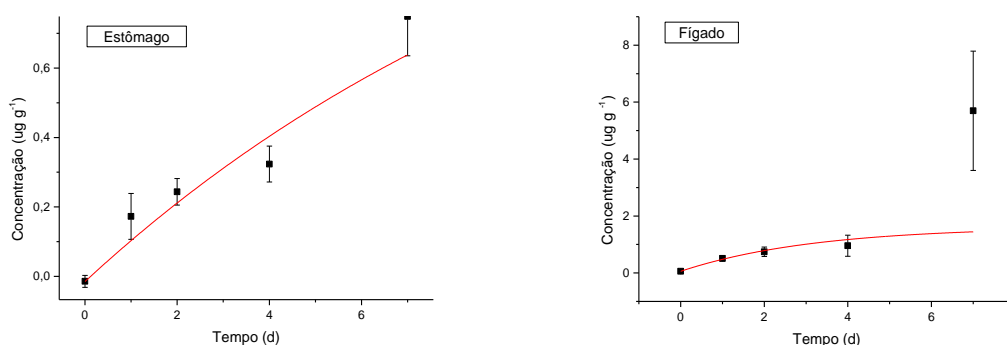
lipídico do tecido. Sendo assim, o alto teor de gordura das amostras de fígado de tilápia poderia explicar a maior concentração de As, em comparação com os tecidos musculares (filé), que apresenta um baixo teor de gordura, que conseqüentemente acumulou menores quantidades de As.

5.2.3 Determinação dos parâmetros toxicocinéticos

Através dos ensaios de bioacumulação e das determinações das concentrações de arsênio inorgânico foi possível a determinação dos parâmetros toxicocinéticos (constantes de absorção (K_a) e depuração (K_d)). O software OriginPro 9.0 (*OriginLab Corporation*) foi utilizado para realizar a regressão não-linear, ajustando a forma integrada da Equação 1 através dos perfis de acumulação do contaminante nos tecidos de interesse e a concentração da água contaminada.

Os perfis de regressão não-linear obtidos pelo software OriginPro 9.0 para os ensaios de bioacumulação com As (III) e (V) apresentaram correlações significativas ($R^2 = 0,81 - 0,99$, $p < 0,05$) e foram resultantes do melhor ajuste do modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem, que assume que a taxa de depuração após a exposição a um contaminante é diretamente proporcional à concentração do contaminante no tecido do peixe (GRECH et al., 2017). Os perfis de regressão não-linear podem ser vistos nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem obtido por regressão não-linear para período de exposição de 7 dias ao As (III)



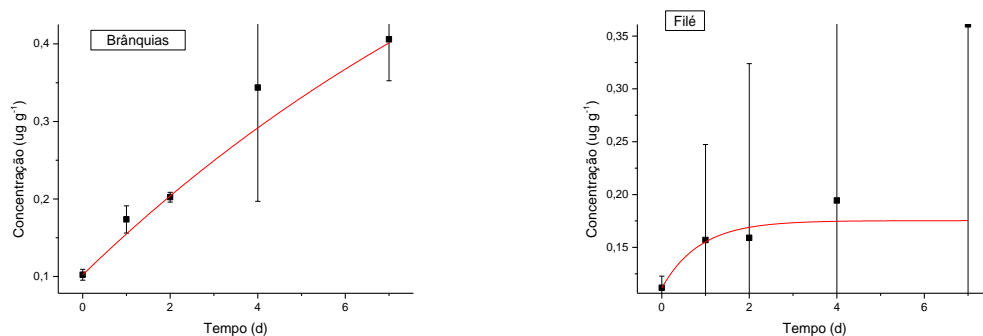
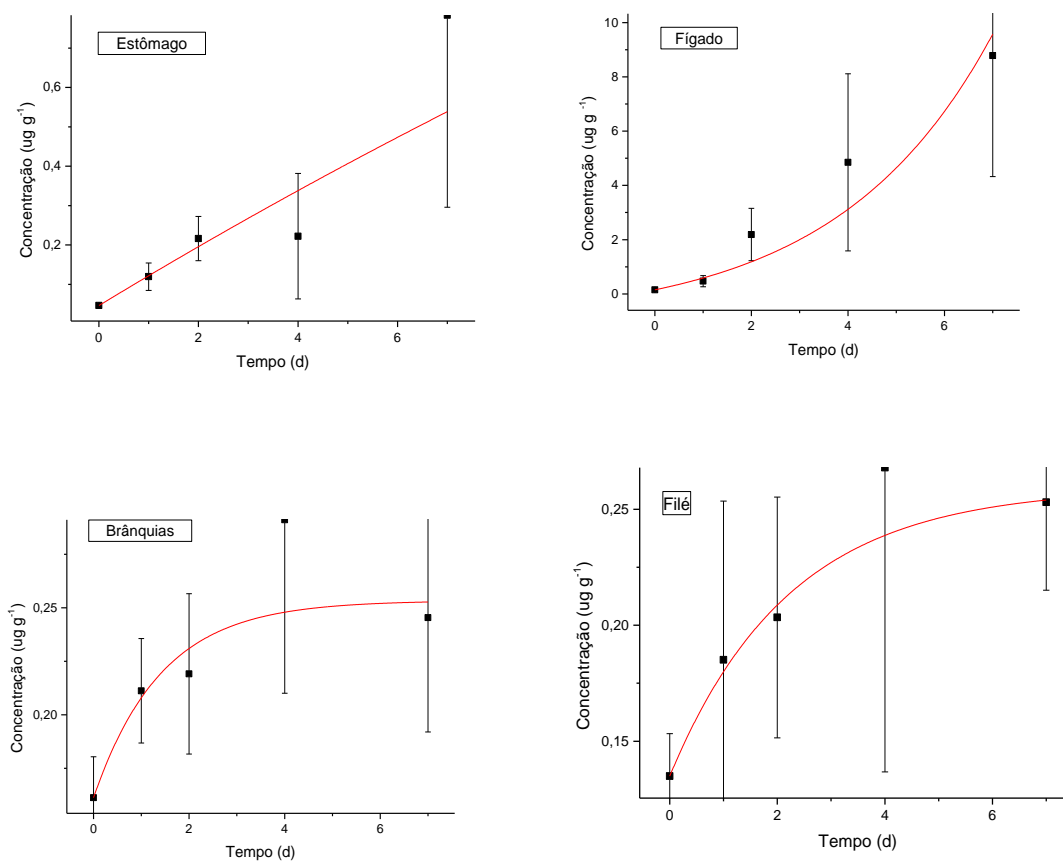


Figura 12 - Modelo de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem obtido por regressão não-linear para período de exposição de 7 dias ao As (V)



Por meio dos gráficos de regressão não-linear foi possível obter os valores das constantes de absorção e depuração (K_a e K_d), e então calcular os fatores de bioconcentração (BCF). A Tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros toxicocinéticos calculados para os tecidos de interesse para a exposição ao As (III) e (V).

Tabela 6 - Estimativas das constantes de absorção (k_a) e depuração (k_d) e fator de bioconcentração (BCF) para os tecidos de interesse durante 7 dias de exposição ao As (III) e (V)

Tecido	Constante de absorção [K_a (mL g ⁻¹ d ⁻¹)]	Constante de depuração [K_d (d ⁻¹)]	Fator de bioconcentração* [BCF (mg g ⁻¹)]
As (III)			
Estômago	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,14	1,48
Fígado	0,51 ± 0,21	0,31 ± 0,41	1,62
Brânquias	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,05	0,84
Filé	0,20 ± 0,12	1,15 ± 0,8	0,18
As (V)			
Estômago	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,18	3,11
Fígado	0,33 ± 0,15	0,31 ± 0,12	1,04
Brânquias	0,18 ± 0,07	0,71 ± 0,30	0,25
Filé	0,12 ± 0,02	0,45 ± 0,09	0,26

* $BCF = k_a/k_d$

As constantes de absorção (k_a) variaram entre 0,06 a 0,51 mL g⁻¹ d⁻¹, enquanto que as constantes de depuração (k_d) variaram entre 0,03 a 1,15 d⁻¹, sendo que em ambos os ensaios o estômago e fígado apresentaram os maiores valores de BCF, o que pode indicar uma maior capacidade em acumular As em ambientes contaminados.

As brânquias e o filé apresentam a capacidade de acumular As, entretanto também apresentam os maiores valores para as constantes de depuração, o que indica a alta capacidade de reduzir ou remover o contaminante do tecido. Tal fato foi comprovado por estudos anteriores que revelou que contaminantes inorgânicos, como As, Zn, Cu, Cr, Hg, Cd e Pb são acumulados mais eficientemente no intestino, estômago e fígado do que no filé da tilápia, o que demonstra que o estômago e fígado desempenham um papel fundamental nos processos de bioacumulação de As (KUREISHY; DE SILVA, 1993; LIANG et al., 1999; TSAI; LIAO, 2006).

As taxas de absorção são dependentes da concentração da água contaminada, dos mecanismos envolvidos na incorporação do contaminante pelos tecidos e são determinadas pelos modelos de bioacumulação “unicompartimental” de primeira ordem obtido por regressão não-linear. Para o ensaio de bioacumulação com As (III), as

maiores constantes de absorção (k_a) ocorreram no fígado, seguido do estômago, filé e brânquias, respectivamente. No estudo realizado por Tsai e Liao (2006) observou-se ordem similar de k_a , exceto pelo fato dos autores terem considerado o sistema digestivo (intestino e estômago) como um único compartimento, assim o valor de k_a ($0,84 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) determinado foi maior do que o do fígado ($0,61 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), o que pode ter colaborado para essa diferença.

Com os dados obtidos no ensaio empregando As (III), o filé apresentou maiores valores de k_a ($0,20 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) quando comparado com os das brânquias ($0,06 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$), diferente do observado no estudo realizado por Tsai e Liao (2006). Contudo, os tecidos de filé apresentaram uma maior constante de depuração ($1,15 \text{ d}^{-1}$), o que resulta em um menor fator de bioconcentração ($0,18 \text{ mg g}^{-1}$), assim explicando sua alta capacidade em eliminar o As.

Um estudo realizado por Liao et al. (2003) mostrou que a tendência de acumulação de As nos tecidos de peixes foi intestino > estômago > fígado > filé \approx brânquias, o mesmo observado nos ensaios de bioacumulação com As (V), que apresentou fator de bioconcentração (BCF) maior para o estômago ($3,11 \text{ mg g}^{-1}$), por conta do menor k_d ($0,03 \text{ d}^{-1}$), o que confere a este tecido uma maior capacidade em bioacumular elevadas concentrações de As.

Com relação ao filé, que representa a maior biomassa da tilápia, e por também ser a parte consumível do peixe, foi verificado em ambos os ensaios de bioacumulação, que é o tecido que apresenta a menor habilidade em absorver o contaminante quando comparado aos demais tecidos estudados, uma vez que apresenta constantes de depuração maiores que as constantes de absorção, o que resulta nos menores fatores de bioconcentração (BCF).

Os valores de BCF específicos para os órgãos acima de 1 (fígado e estômago) indicam que os tecidos têm o potencial de acumular arsênio quando expostos a espécies de iAs (TSAI; LIAO, 2006). O acúmulo de arsênio nos tecidos do estômago e fígado das tilápias foi refletido pela diferença significativa entre os parâmetros toxicocinéticos k_a e k_d , uma vez que acúmulo de um contaminante ocorre quando a constante de depuração é menor que a constante de absorção, como observado para o estômago e o fígado. Já quando a constante de taxa de depuração é maior que a constante de taxa de

absorção, o tecido tem uma capacidade menor de absorver As, como observado para as brânquias e o filé, o que está de acordo com estudos recentes de Chen et al. (2018).

5.3. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS ESPÉCIES INORGÂNICAS

Como apresentado anteriormente foram utilizadas amostras de tecidos de peixes fornecidos pelo próprio grupo de pesquisa (GIQAV) para a otimização dos métodos de extração e fracionamento de As. Os tecidos utilizados foram filé de Abrótea (*Urophycis brasiliensis*), filé de Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*), filé de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e Camarão vermelho. Os procedimentos de preparo de amostra para a determinação total de As nesses tecidos e nas diferentes frações obtidas através das extrações sequenciais para obter as frações de lipídios e proteínas foram seguidos segundo a metodologia proposta por Kannamkumarath et al. (2002).

5.3.1 Determinação do As total

Antes de iniciar as análises de fracionamento foi necessário realizar a determinação do As total das amostras utilizadas para a otimização do método, para que ao final fosse possível realizar o balanço de massas nas diferentes frações obtidas pelas extrações. As amostras foram digeridas em forno micro-ondas, utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio de acordo com o trabalho de Oliveira et al. (2017) e as determinações foram realizadas por ICP-MS. Os resultados da determinação de As total nas amostras de peixes estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de As total nas amostras de peixes (n=2, \pm SD)

Amostra	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Filé de Abrótea	$2,26 \pm 0,03$
Filé de Pangasius	$0,09 \pm 0,02$
Camarão vermelho	$1,32 \pm 0,04$
Filé de Tilápia	$0,98 \pm 0,02$

5.3.2 Fracionamento lipídico e proteico em amostras de peixe e frutos do mar

Após a determinação da concentração de As total nas amostras de peixes e frutos do mar, a concentração desse elemento foi avaliada nas frações lipídicas e proteicas. Os lipídios são moléculas orgânicas com características hidrofóbicas e que são solúveis em solventes orgânicos, como por exemplo, clorofórmio, éter e metanol (LIM; YILDIRIM-AKSOY; KLESIUS, 2011). Nesse trabalho, a fração de lipídios das amostras de peixes foram extraídas utilizando uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 v/v). A concentração de As nessa fração foi calculada através da diferença entre a concentração total de As na amostra e a concentração de As determinada na amostra após a extração. Para isso, após a extração lipídica, o resíduo da extração foi digerido em forno micro-ondas e a determinação de As foi realizada por ICP-MS. Os resultados estão na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração de As no resíduo da extração lipídica e na fração lipídica (n=2, \pm SD).

Amostra	Concentração de As no resíduo da extração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de As na fração lipídica ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Filé de Abrótea	0,51 \pm 0,06	1,75 \pm 0,06
Filé de Pangasius	0,08 \pm 0,004	0,01 \pm 0,02
Camarão vermelho	0,76 \pm 0,0001	0,56 \pm 0,04
Filé de Tilápia	0,13 \pm 0,003	0,85 \pm 0,02

De acordo com estudos, a mistura de solvente clorofórmio-metanol mostrou-se adequada para a extração completa de lipídios em tecidos de peixes, e apresentou uma correlação positiva entre o acúmulo de um contaminante e seu conteúdo lipídico (SCHLECHTRIEM; FLIEDNER; SCHÄFERS, 2012). Entretanto, segundo a Tabela 8 pode-se verificar que somente nas amostras de filé de Abrótea e tilápia que o As se encontra em maior concentração na fração lipídica, diferente das amostras de filé de Pangasius e camarão vermelho onde maiores teores de As foram encontrados na porção proteica.

Foram realizadas análises de extrato etéreo e proteína bruta nas amostras de filé de Pangasius e Camarão vermelho a fim de verificar a proporção entre gorduras e proteínas, e os resultados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagem de extrato etéreo (gordura) e proteína bruta para as amostras de filé de Pangasius e Camarão vermelho

Amostra	Extrato etéreo (%)	Proteína bruta (%)
Filé de Pangasius	17,01	64,48
Camarão vermelho	3,43	67,42

De acordo com os resultados obtidos de extrato etéreo e proteína bruta é possível verificar que os tecidos apresentam uma maior proporção de proteína, o que evidencia o fato do As estar presente em maior concentração na fração proteica.

Após a extração da fase lipídica da amostra foram realizadas as extrações proteicas. Na extração proteica foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio, pois as proteínas são solúveis em meio alcalino. Em seguida, a solução foi neutralizada com ácido fosfórico e a precipitação das proteínas ocorreu pela adição de acetona sob baixas temperaturas, uma vez que solventes orgânicos solúveis em água diminuem a solubilidade das proteínas, pois possuem constantes dielétricas baixas (SIMPSON; BEYNON, 2010). A fração proteica e o resíduo da extração foram digeridos e as concentrações de As foram determinadas por ICP-MS e apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração de As no resíduo da extração proteica e na fração proteica (n=2, ± SD).

Amostra	Concentração de As no resíduo da extração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de As na fração proteica ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Filé de Abrótea	$0,095 \pm 0,004$	< LOQ*
Filé de Pangasius	$0,047 \pm 0,020$	$0,036 \pm 0,012$
Camarão vermelho	$0,425 \pm 0,030$	$0,046 \pm 0,013$
Filé de Tilápia	$0,005 \pm 0,003$	$0,005 \pm 0,001$

* LOQ = $1,04 \times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$

A determinação da concentração de As no resíduo da extração da amostra de filé de Pangasius mostra que não houve perdas do analito durante o processo da extração proteica, pois as concentrações de As determinadas na fase proteica e no resíduo da extração de proteínas foram, respectivamente, $0,036 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,047 \pm 0,020 \mu\text{g g}^{-1}$, a qual a soma é muito próxima à concentração da amostra sem gordura ($0,08 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$). No entanto, o mesmo não pode ser observado para as demais amostras, e uma possível explicação seria o fato do As ter sido lixiviado para o sobrenadante da extração, fato que torna necessário realizar estudos adicionais para otimização da metodologia utilizada para a extração proteica em amostras que apresentem maiores concentrações de arsênio.

5.3.3 Fracionamento lipídico e proteico nos tecidos dos ensaios da bioacumulação

O fracionamento lipídico e proteico nas amostras de filé dos peixes utilizados nos ensaios de bioacumulação era parte dos objetivos do trabalho. No entanto, por não haver amostra suficiente para a realização dos procedimentos de extração, foi necessário fazer uma mistura das amostras de um grupo que possuía massa suficiente para tais procedimentos. Sendo assim, o “pool de amostra” foi realizado com os peixes do grupo G7 dos ensaios de bioacumulação. Primeiramente, uma nova digestão dos tecidos foi realizada para determinar a concentração total de As, e também a fim de comparação com os resultados obtidos nos ensaios de bioacumulação. Os resultados estão mostrados na Tabela 11. Outro problema que averiguamos é que a concentração empregada nos ensaios de bioacumulação ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) era baixa, o que inviabilizou o emprego destes métodos de extração para os tecidos.

Tabela 11 - Concentração de As total nos tecidos de filé determinado pelos ensaios de bioacumulação e a na nova digestão realizada

Amostra	Concentração de As total determinado pelos ensaios de bioacumulação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de As total determinado na nova digestão ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Filé G7 (As (III))	0,36 \pm 0,06	0,32
Filé G7 (As (V))	0,25 \pm 0,04	0,23

Por conta da reduzida quantidade de amostra para realizar as extrações, a determinação da concentração de As total nas amostras dos filés dos ensaios de bioacumulação foi realizada somente em uma única replicata, no entanto, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de bioacumulação, não houve uma diferença significativa entre os resultados, o que indica que o método utilizado apresenta reprodutibilidade. Após a determinação da concentração total de As nas amostras, a concentração de As foi avaliada nas frações lipídicas e proteicas. A concentração de As na fração lipídica foi determinada pela diferença entre a concentração de As total na amostra e a concentração de As na amostra após a extração lipídica, e os resultados podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração de As no resíduo da extração lipídica e na fração lipídica dos tecidos de filé do ensaio da bioacumulação

Amostra	Concentração de As no resíduo da extração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração de As na fração lipídica ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Filé G7 (As (III))	0,05	0,27
Filé G7 (As (V))	0,13	0,10

De acordo com estudos, era esperado que o As se encontrasse em maior concentração na fração lipídica, pois contaminantes tendem a se bioacumular nessa fração. No entanto, para a amostra de filé do ensaio de bioacumulação com As (V), o As encontra-se em maior concentração na amostra após a extração lipídica, muito

provavelmente ligado a fração proteica. Após a extração da fase lipídica das amostras, foram realizadas as extrações proteicas, e a fração proteica e o resíduo da extração foram digeridos em forno micro-ondas para a determinação de As por ICP-MS. Entretanto, as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação ($1,65 \times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$), e sugere-se um estudo mais detalhado para a otimização da extração proteica.

Outra possibilidade seria realizar esses estudos de fracionamento com diferentes tecidos de peixes, como por exemplo, um tecido de fígado, que apresenta altas concentrações de gordura, assim seria possível avaliar a tendência de bioacumulação do As na fração lipídica e proteica. Vale ressaltar que os tecidos de peixe também deveriam apresentar maiores concentrações de arsênio. No entanto, por conta da indisponibilidade de amostra não foi possível realizar o fracionamento em outros tecidos das tilápias dos ensaios da bioacumulação, mas estudos adicionais estão sendo realizados com amostras de tilápias provenientes de estudos de toxicidade aguda, as quais apresentam uma concentração maior de As.

6. CONCLUSÃO

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) mostrou-se eficiente na determinação de arsênio em tecidos biológicos e água, apresentando boa exatidão e precisão. A exatidão do método foi confirmada por meio da análise dos materiais de referência certificados, que apresentaram valores de recuperação na faixa de 80 a 110%. O uso do ICP-MS foi uma boa ferramenta analítica para a determinação de arsênio total nas amostras de tecido de peixe, não apresentando problemas de interferência espectral na razão massa/carga 75, possibilitando o seu uso no modo padrão de funcionamento sem a necessidade de utilizar a célula de colisão (KED).

As concentrações de arsênio total determinadas nas tilápias expostas ao As (III) pelo ensaio de bioacumulação variaram na faixa de 0,06 – 5,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 0,15 – 0,75 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos estômagos, 0,10 – 0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e 0,11 – 0,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos filés, enquanto que para as tilápias expostas ao As (V), as concentrações variaram na faixa de 0,15 – 8,79 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos fígados, 0,05 – 0,78 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos estômagos, 0,16 – 0,29 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas brânquias e 0,13 – 0,27 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos filés.

Apesar dos valores diferentes de concentrações, o mesmo padrão de bioacumulação nos tecidos foi observado em ambos os ensaios, sendo a ordem fígado > estômago > brânquias > filé. A partir desses resultados pode-se concluir que o fígado e o estômago apresentam um papel importante na absorção e acúmulo do contaminante. Além disso, os ensaios de bioacumulação comprovaram que o filé apresenta grande habilidade em reduzir o contaminante no tecido, quando comparado aos outros órgãos.

A partir dos ensaios de bioacumulação foi possível realizar a determinação dos parâmetros toxicocinéticos (k_a , k_d e BCF) que avaliam a capacidade que os tecidos possuem em absorver e depurar o As.

Por meio dos estudos de fracionamento lipídico e proteico nas amostras de peixes e frutos do mar, foi possível verificar que o arsênio inorgânico encontra-se em maior concentração na fração lipídica nos tecidos de filé de Abrótea e tilápia. No entanto, a mesma tendência não foi observada nos tecidos de Pangasius e Camarão vermelho. A extração proteica se mostrou eficiente somente para a amostra de filé de Pangasius, uma vez que o somatório das concentrações de As na fração proteica e no

resíduo da extração foram muito próximas da concentração determinada no resíduo da extração lipídica.

A mesma metodologia estudada foi aplicada aos tecidos de filé provenientes dos ensaios de bioacumulação, no entanto os resultados são inconclusivos. Assim, torna-se necessário realizar novos estudos de otimização das metodologias para que seja possível aplicar em diferentes tecidos e avaliar a forma com o arsênio se distribui nas frações lipídicas e proteicas.

REFERÊNCIAS

AGAH, H. et al. Concentrations of some trace metals in the tissues of two commercial fishes from Tonekabon. **Journal of the Persian Gulf**, Tehran, v. 1, n. 2, p. 55-64, 2010.

AGAZZI, A.; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, New York, v. 67, n. 1, p. 337-341, 2000.

ALAM, M. G. M. et al. A comparison of trace element concentrations in cultured and wild carp (*Cyprinus carpio*) of lake Kasumigaura, Japan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 53, n. 3, p. 348–354, 2002.

ATTAR, K. M. et al. Levels of arsenic in fish from the Arabian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 94–97, 1992.

AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY (ANZFA). **Australia New Zealand food standards code**: – schedule 19: – maximum levels of contaminants and natural toxicants. 2017.

AYROZA, L. M. S. **Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. 92 folhas. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

BARRA, C. M. et al. Especificação de arsênio: - uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 58–70, 2000.

BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. **Environmental Pollution**, Barking, v. 126, n. 1, p. 9–19, 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Amostragem do Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes para o ano 2016**. Brasília, 2016. Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos->

animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pnrc/pnrc-2016.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). **Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animais/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 7 jun. 2017.

BRASIL. Portal Brasil. **Produção de peixes no Brasil cresce com apoio de pesquisas da Embrapa**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

BRASIL. Resolução nº 166, de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jul 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 5 jun 2018.

BRASIL. Resolução nº 357, de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar 2005. Seção 53, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 22 jul 2017.

BRASIL. Resolução nº 42, de 2013. Dispõe sobre o regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 set. 2013. v. 2, n. 2200, Seção 1, p. 33-35. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html>. Acesso em: 22 jul. 2017.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.

CAMPOS, E. **Consumo de peixes nunca foi tão alto no Brasil**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/jornal-da-pecuaria/consumo-peixes-nunca-foi-cao-alto-brasil-71704>>. Acesso em: 3 mai. 2018.

CHEN, B. C.; LIAO, C. M. Farmed tilapia *Oreochromis mossambicus* involved in transport and biouptake of arsenic in aquacultural ecosystems. **Aquaculture: an international journal devoted to fundamental aquatic food resource**, Amsterdam, v. 242, n. 1/4, p. 365-380, 2004.

CHEN, L. et al. Effects of acclimation on arsenic bioaccumulation and biotransformation in freshwater medaka *Oryzias mekongensis* after chronic arsenic exposure. **Environmental Pollution**, Barking, v. 238, p. 17–25, 2018.

CHEN, W.; LIAO, C. M. Toxicokinetics/toxicodynamics links bioavailability for assessing arsenic uptake and toxicity in three aquaculture species. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 19, n. 9, p.3868-3878, 2012.

DE CAMPOS, C. M. et al. Avaliação econômica da criação de tilápias em tanque-rede, município de Zacarias, SP. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 33, n.2, p. 265-271, 2007.

DE LA CALLE, M. B. et al. Is it possible to agree on a value for inorganic arsenic in food?: the outcome of IMEP-112. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, n. 8, p. 2475-2488, 2012.

EL-SAYED, A. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture: an international journal devoted to fundamental aquatic food resource**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 149-168, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Pesca e aquicultura: perguntas e respostas**. Brasília, s.d. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/perguntas-e-respostas>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

ERSOY, B.; ÖZEREN, A. The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 2, p. 419-422, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on arsenic in food. EFSA panel on contaminants in the food chain (CONTAM). **EFSA Journal**, Hoboken, 7, 1351-1550, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes**. 1988.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture 2016**: contributing to food security and nutrition for all. 2016.

FIGUEIREDO JUNIOR, C. A.; VALENTE JÚNIOR, A. S. Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, n. 46, 2008, Rio Branco, Acre, Brasil. [**Anais...**] Rio Branco, Acre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural - SOBER, 2008. p. 1-19.

FIORI, M.; SCINTU, M. F.; ADDIS, M. Characterization of the lipid fraction in lamb meat: comparison of different lipid extraction methods. **Food Analytical Methods**, New York, v. 6, n. 6, p. 1648–1656, 2013.

FOLCH, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONG, B. A.; WU, W.-Y.; WOOD, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 198–202, 2009.

FONTCUBERTA, M. et al. Total and inorganic arsenic in marketed food and associated health risks for the catalan (Spain) population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton v. 59, n. 18, p. 10013-10022, 2011.

FOSTER, S. et al. A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues. **Talanta**: an international journal of analytical chemistry, London, v. 71, n. 2, p. 537–549, 2007.

FOWLER, B. A. et al. Arsenic. In: NORDBERG, G. F. **Handbook on the toxicology of metals**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 367–406.

FRANCESCONI, K. A.; KUEHNELT, D. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000–2003. **Analyst**, London, v. 129, n. 5, p. 373-395, 2004.

GARG, S.; GUPTA, R. K.; JAIN, K. L. Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in indian major carps. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 2–3, p. 1369–1384, 2009.

GONZALEZ, M. H. et al. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta: an international journal of analytical chemistry**, London v. 79, n. 2, p. 396–401, 2009.

GRECH, A. et al. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 578, p. 1–15, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HERMES, C. A.; TAKAMATSU, A. A.; SEEFELD, M. Cultivo de peixes em biosistema integrado. **Varia Scientia**, Cascavel, v. 7, n. 13, p. 11-24, 2009.

ICH, I. C. H. Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, Geneva. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 revisão 04. Rio de Janeiro, 2011.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, Champaign, v. 36, n. 11, p. 1283–1287, 2001.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1023, n. 2, p. 317–320, 2004.

KALANTZI, I. et al. Arsenic speciation in fish from greek coastal areas. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 56, p. 300–312, 2017.

KANNAMKUMARATH, S. S. et al. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, n. 6, p. 454-460, 2002.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, Baltimore, v. 106, n. 21, p. 2747-2757, 2002.

KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba: FJ Krug, 2008.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 59, p. 44-53, 2000.

KUREISHY, T. W.; DESILVA, C. Uptake and loss of mercury, cadmium and lead in marine organisms. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 1, n. 31, p. 373-379, 1993.

LIANG, Y.; CHEUNG, R. Y. H.; WONG, M. H. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. **Water Research**, New York, v. 33, n. 11, p. 2690-2700, 1999.

LIAO, C. M. et al. Acute toxicity and bioaccumulation of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from a blackfoot disease area in Taiwan. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 4, p. 252-259, 2003.

LICATA, P. et al. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the straits of Messina (Sicily, Italy). **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 107, n. 1-3, p. 239-248, 2005.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. Lipid and fatty acid requirements of tilapias. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 188-193, 2011.

MANSOUR, S. A.; SIDKY, M. M. Ecotoxicological studies: 3: heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. **Food Chemistry**, Easton, v. 78, n. 1, p. 15-22, 2002.

MARTINEZ, V. D. et al. Arsenic exposure and the induction of human cancers. **Journal of Toxicology**, New York, v. 2011, 2011.

MATOS, W. O. **Desenvolvimento de procedimentos de digestão e especificação para amostras biológicas**. 2011. 111 folhas. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

MATULIS, D. Selective precipitation of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, Hoboken, v. 2016, p. 4.5.1-4.5.37, 2016.

MDEGELA, R. et al. Evaluation of the gill filament-based EROD assay in african sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants. **Ecotoxicology**, Dordrech, v. 15, n. 1, p. 51–59, 2006

MENDIL, D. et al. Determination of trace metal levels in seven fish species in lakes in Tokat, Turkey. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 1–2, p. 175–179, 2005.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia = Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 262-267, 2003.

MOLIN, M. et al. Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology–review focusing on seafood arsenic. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 31, p. 249-259, 2015.

NANDI, D.; PATRA, R. C.; SWARUP, D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. **Toxicology**, Limerick, v. 211, n. 1/2, p. 26–35, 2005.

NARUKAWA, T. et al. Effect of the chemical species of arsenic on sensitivity in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, Tokyo, v. 24, n. 3, p. 355–360, 2008.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein extraction and precipitation. In: **Proteomic profiling and analytical chemistry**, Amsterdam, Elsevier, p. 51–62, 2016.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **OECD guidelines for the testing of chemicals**. 1994.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **Test 203: fish**,

acute toxicity test. In: **OECD guidelines for the testing of chemicals**: section 2, 1992.

OHKI, A. et al. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II: accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia mossambica*. **Chemosphere**: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems, Oxford, v. 46, n. 2, p. 325-331, 2002.

OLIVEIRA, L. H. B. **Avaliação dos teores de arsênio em tecidos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e estudo da bioacumulação de As (III)**. 2017. 81 folhas. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2017.

OLIVEIRA, L. H. B. et al. Evaluation of distribution and bioaccumulation of arsenic by ICP-MS in tilapia (*oreochromis niloticus*) cultivated in different environments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, n. 12, p. 2455–2463, 2017.

PAZHANISAMY, K.; VASANTHY, M.; INDRA, N. Bioaccumulation of arsenic in the freshwater fish *Labeo Rohita* (HAM.). **Group**, [S.1], v. 7, n. 14, p. 21, 2006.

PEREIRA, P. et al. Looking at the aquatic contamination through fish eyes: – a faithful picture based on metals burden. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 77, n. 1/2, p. 375–379, 2013.

PÉTURSDÓTTIR, A. H. et al. HPLC-HG-ICP-MS: a sensitive and selective method for inorganic arsenic in seafood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 404, n. 8, p. 2185-2191, 2012.

PLANELLO, D. R. F. et al. Mercado da tilápia no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 46, n. 5. 2016

Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, v. 44, 2016. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>.
Acesso em: 16 maio 2018.

PRÖFROCK, D.; PRANGE, A. Inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 66, n. 8, p. 843-868, 2012.

QUEIROZ, M. A.; LINS, E. S. The national agricultural laboratories of Brazil and the control of residues and contaminants in food. **Food Additives & Contaminants: Part A: chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, Abingdon, v. 29, n. 4, p. 482-489, 2012.

ROCHA, D. L. et al. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 79–92, 2013.

ROSTOM, H.; SHINE, B. Basic metabolism: proteins. **Surgery**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 153–158, 2018.

SCHENONE, N. F.; VACKOVA, L.; FERNANDEZ CIRELLI, A. Differential tissue accumulation of arsenic and heavy metals from diets in three edible fish species. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 364-371, 2014.

SCHLECHTRIEM, C.; FLIEDNER, A.; SCHÄFERS, C. **Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: contributions to the revision of guideline OECD 305. Environmental Sciences Europe**, Heidelberg, v. 24, n. 1, p. 13, 2012.

SIMPSON, D. M.; BEYNON, R. J. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 1, p. 444–450, 2010.

SMITH, A. H. et al. Arsenic epidemiology and drinking water standards. **Science**, Washington, v. 296, n. 5576, p. 2145-2146, 2002.

SQUADRONE, S. et al. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere: chemistry, physics and biology as focused on environmental problems**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 358–365, 2013.

SUSSEL, F. R. Tilapicultura no estado de São Paulo. **Pesquisa e Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 4, 2011.

TAWHEEL, A.; SHUHAIMI-OTHMAN, M.; AHMAD, A. K. Assessment of heavy metals in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from the Langat River and Engineering lake in Bangi, Malaysia, and evaluation of the health risk from tilapia consumption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 93, p. 45-51, 2013.

TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

TSAI, J. W. et al. Toxicokinetics of tilapia following high exposure to waterborne and dietary copper and implications for coping mechanisms. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 20, n. 6, p. 3771-3780, 2012.

TSAI, J. W.; LIAO, C. M. A dose-based modeling approach for accumulation and toxicity of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, n. 1, p. 8–21, 2006

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ecological effects test guidelines**. OPPTS 850.1075: fish acute toxicity test, freshwater and marine. Washington, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. . Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VENTURA-LIMA, J. et al. Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, n. 12, p. 3479–3484, 2009.

VENTURA-LIMA, J.; BOGO, M. R.; MONSERRAT, J. M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 3, p. 211–218, 2011.

VICENTE-MARTORELL, J. J. et al. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 162, n. 2–3, p. 823–836, 2009.

WU, X. et al. The arsenic content in marketed seafood and associated health risks for the residents of Shandong, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 102, p. 168-173, 2014.

YOSIM, A.; BAILEY, K.; FRY, R. C. Arsenic, the "king of poisons," in food and water. **American Scientist**, New Haven, v. 103, n. 1, p. 34, 2015.

ZHANG, W.; HUANG, L.; WANG, W. X. Arsenic bioaccumulation in a marine juvenile fish *Terapon jarbua*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 582-588, 2011.